



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

VLIV HYALURONANU NA VLASTNOSTI OČNÍCH KAPEK OPTHALMO-SEPTONEX

EFFECTS OF HYALURONAN ON PROPERTIES OF OPTHALMO-SEPTONEX EYE
DROPS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Chromá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1058/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Kateřina Chromá	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Vliv hyaluronanu na vlastnosti očních kapek Ophthalmo-Septonex

Zadání bakalářské práce:

Seznámit se s vlastnostmi tenzidu septonex a jeho využitím v medicínských výrobcích, zejména očních kapkách a masti Ophthalmo-Septonex. Seznámit se se základními vlastnostmi hyaluronanu a jeho využitím v medicíně. Navrhnout vhodnou a stabilní úpravu uvedených očních kapek přídatkem hyaluronanu a stanovit základní fyzikálně-chemické vlastnosti výsledného systému.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kateřina Chromá
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Modifikace očních kapek pomocí hyaluronanu vede ke zvýšení času zadržení na očním povrchu. Pomocí Mahrousovy modifikované metody, byly stanovovány koncentrace Septonexu ve vodě. Posléze pomocí postupného přidavku hyaluronanu do očních kapek OphthalmoSeptonex byla zjištěna vhodná koncentrace pro membránovou dialýzu. Pomocí membránové dialýzy byla sledována interakce hyaluronan-septonex. Následně byla proměřena velikost a náboj částic.

ABSTRACT

Modification of eye drops using hyaluronan to increase retention time on the eye surface. Using modification of Mahrous method have been determined concentration of Septonex in water. Then using gradual addition of hyaluronan into Ophthalmo-Septonex eye drops was investigated appropriate concentration for membrane dialysis. With membrane dialysis was observed interaction hyaluronan-septonex. Then was determined size and charge of particles.

KLÍČOVÁ SLOVA

Oční kapky, Ophthalmo-Septonex, UV-VIS spektrometrie, dialýza, zeta potenciál, velikost částic

KEYWORDS

Eye drops, Ophthalmo-Septonex, UV-VIS spectrometry, dialysis, zeta potential, size of particles

CHROMÁ, K. *Vliv hyaluronanu na vlastnosti očních kapek Ophthalmo-Septonex*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 48 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce panu profesorovi Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky. Dále velký dík patří Ing. Tereze Pilgrové, Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. a Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za vstřícnost, cenné rady, pomoc a ochotu při vypracování experimentální části bakalářské práce. Velký dík patří také mé rodině za podporu v průběhu studia.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	3
KLÍČOVÁ SLOVA.....	3
KEYWORDS	3
OBSAH.....	6
ÚVOD.....	8
1. TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1 Oko	9
1.2 Oční přípravky	9
1.2.1 Vlastností očních přípravků.....	9
1.2.2 Typy očních přípravků	10
1.2.3 Ophthalmo-Septonex.....	10
1.3 Slzy.....	11
1.3.1 Slzný film.....	11
1.3.2 Onemocnění očí	12
1.4 Mukoadhezivní látky.....	15
1.4.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	15
1.4.2 Vlastnosti mukoadhezivního polymeru.....	16
1.4.3 Mukoadhezivní látky s využitím v oftalmologii [10].....	17
1.5 Kyselina hyaluronová.....	18
1.5.1 Chemické a fyzikální vlastnosti.....	18
1.5.2 Výskyt a funkce	18
1.5.3 Historie a využití	19
1.6 Asociativní (micelární) koloidy	19
1.6.1 Molekulární struktura a povaha micelárních koloidů	19
1.6.2 Kritická micelární koncentrace	20
1.7 UV-VIS spektrometrie.....	20
1.7.1 Kyselina pikrová	21
1.8 Membránové separační metody	22
1.8.1 Dialýza.....	22

1.9	Měření velikosti částic.....	23
1.10	Náboj částic – zeta potenciál.....	23
1.11	Viskozita	23
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	25
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	Použité chemikálie	26
3.2	Příprava zásobních roztoků.....	27
3.2.1	Zásobní roztok 1mM Septonexu	27
3.2.2	Zásobní roztok 0,01% kyseliny pikrové.....	27
3.2.3	Zásobní roztok hyaluronanu	27
3.3	Příprava vzorků	27
3.3.1	Příprava vzorků Septonexu.....	27
3.3.2	Příprava vzorku Ophthalmo-Septonexu s přidavkem hyaluronanu	27
3.4	Modifikovaná Mahrousova metoda-příprava vzorků pro měření	27
3.4.1	Měření.....	28
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	29
4.1	Kalibrační křivka Septonexu.....	29
4.2	Zjištění koncentrace pro dialýzu	30
4.3	Dialýza.....	31
4.3.1	Dialýza systému Ophthalmo-Septonex a hyaluronan	31
4.3.2	Dialýza Ophthalmo-Septonex-voda	32
4.3.3	Vyhodnocení	33
4.4	Experiment s rohovkou z prasečího oka.....	33
4.5	Měření velikosti částic.....	35
4.6	Měření náboje částic – zeta potenciál.....	36
4.7	Měření viskozity.....	37
	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ.....	41
	SEZNAM GRAFŮ	45
	SEZNAM OBRÁZKŮ	46
	SEZNAM TABULEK	47
	SEZNAM ZKRATEK	48

ÚVOD

Lidské oko je jeden z hlavních smyslových orgánů člověka, který je nezbytný pro získávání informací o okolním světě. Je uloženo v kostěné dutině – orbitě a kryto víčky. Samotná oční bulva je chráněna a zvlhčována slzným filmem, který je nesmírně důležitý při ochraně proti infekcím nebo osychání oka. Další jeho důležitou vlastností je dostatečné vyživení rohovky. Pokud je oko postiženo nějakým zánětem nebo mechanicky poškozeno, je to právě slzný film, který přichází do kontaktu se všemi léčivy.

V dnešní době neustále přibývá lidí trpících nějakou oční vadou. Příčinou může být uspěchaný životní styl, dlouhodobé a časté „zírání“ do počítače, či zpříjemňování si horkých letních dnů klimatizací. To může vést až k trvalé refrakční vadě, kterou je možné korigovat brýlemi nebo kontaktními čočkami. Pro užívání kontaktních čoček je důležitý právě slzný film, na kterém si kontaktní čočka „plave“. Tohoto principu by se v blízké době dalo využít i při aplikaci léčiv, kdy léčivá látka setrvává déle na povrchu oka. Tím by se rapidně zvýšila účinnost léčiva. Poruchu slzného filmu je možné diagnostikovat i jako vedlejší účinek užívání různých běžně předepisovaných léčiv jako jsou například antihistaminika, důležité při léčbě alergií. Dále také antidepresiva, která jsou stále častěji využívána v dnešní době a hormonální antikoncepce, kterou užívají ženy po dlouhou životní etapu.

Kyselina hyaluronová bývá často přidávána do léčiv, např. do nosních sprejů na zvlhčení sliznice. Jedná se o tělu vlastní polysacharid, který se nachází ve velké míře v očním sklivci, synoviální tekutině v kolenním kloubu, ale také jako složka vazů a šlach. V dnešní době je kyselina hyaluronová hojně využívána v lékařství například při plastických operacích pro bezjizvé hojení. Některé firmy uvádějí, že kyselina hyaluronová má také „anti-aging“ účinky, čehož hojně využívá kosmetický průmysl [4]. Jedná se o viskózní látku, která má schopnost interagovat s různými látkami. Interakce hyaluronanu s dalšími látkami, jsou předmětem mnoha výzkumů v oblasti cílených nosičů léčiv, především při výzkumu léků proti zhoubnému rakovinnému bujení, které postihuje stále více pacientů všech věkových kategorií. Léky proti rakovině jsou nespecifické, a proto postihují převážně celý organismus, čímž způsobují mnoho vedlejších účinků. Mezi nejčastější vedlejší účinky patří nevolnost, zvracení, horečka, úbytek krevních buněk (krvinky, destičky), infekce a spousta dalších. Nejčastěji předepisované léky jsou cytostatika, která potlačují růst tkání s vysokou frekvencí buněčného dělení. Jejich nevýhodou je, že jsou nespecifická, čímž velmi často poškozují i zdravé tkáně rychle rostoucí (kostní dřevina) a snižují tvorbu krevních elementů. S pomocí cílených nosičů léčiv by bylo možné předejít většině vedlejších účinků a zvýšit účinnost léčby.

Bakalářská práce je prováděna na očních kapkách Ophthalmo-Septonex, které jsou běžně předepisovány pro léčbu zánětu víček a spojivek. Patří mezi paletu běžných očních přípravků, které je možné aplikovat každé dvě hodiny [27]. Velmi častá aplikace však snižuje pohodlí pacienta a také vypovídá o malé účinnosti jedné kapky. Nízká účinnost je způsobena zejména tím, že kapka setrvává na očním povrchu pouze malou chvíli a následně steče do slzovodů, kterými je odplavena. Hlavní léčivou látkou očních kapek Ophthalmo-Septonex je septonex, neboli carbethopendeciniibromidum. Ten se řadí do kategorie kationtových tenzidů, které ve vodném prostředí disociují. Cílem této práce je různými metodami stanovit, zda se po přidání hyaluronanu do očních kapek zvýší doba zádrže na očním povrchu a tím i účinnost očních kapek. To by mělo vést ke snížení četnosti aplikace, která bývá u těchto léčiv běžně i každou hodinu. Zároveň by oko bylo vyživováno a zvlhčováno kyselinou hyaluronovou. To by vedlo ke snížení výskytu suchého oka, které vzniká převážně v důsledku časté aplikace léčiva.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Oko

Oko představuje vysoce specializovaný orgán, který umožňuje nejen přesnou analýzu formy předmětu, ale i rozlišení barev a vnímání intenzity světla. Oční bulva je kulovitého tvaru a nachází se v obličejové části lebky v očníci. Ze zadní části oční bulvy vystupuje zrakový nerv, který inervuje oko a působí jako přenašeč vzruchů. Stěna očnice je složena ze tří vrstev: vnější povrchové, která se dělí na bělimu a rohovku, střední cévnatá, do které patří cévnatka, řasnaté tělísko a duhovka a vnitřní tvořenou světločivnou sítnicí. Z přídavných orgánů oka je třeba zmínit spojivku, latinským názvem uniaconjunctiva. Spojivka je slizniční blána sytě růžové barvy, která ohybem přechází na oční kouli a kryje zepředu bělimu až po okraj rohovky. Velmi často bývá postižena záněty, protože je v kontaktu s vnějším prostředím. Její funkcí je ochrana a zajištění hladkého pohybu víček přes bulvu a sekrece hlenu, který je součástí slzného filmu [7], [9].

1.2 Oční přípravky

Pro léčbu problému či poškození oka se využívá různých léčivých přípravků. Jelikož oko je velmi citlivý orgán, musí mít přípravek velmi specifické vlastnosti. Mezi ty patří osmotický tlak, povrchové napětí, pH roztoku, viskozita a koncentrace roztoku, ale také mikrobiální čistota přípravku. Pro moji práci jsme vybrali oční kapky Ophthalmo-Septonex.

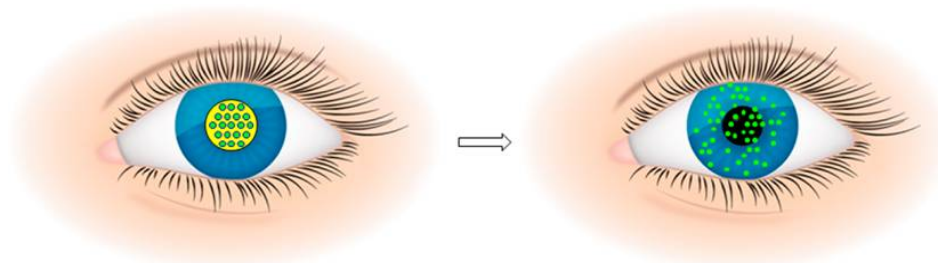
1.2.1 Vlastností očních přípravků

Při přípravě léčivého přípravku musíme dbát zejména na osmotický tlak. Abychom předešli bolestivé aplikaci léčivého přípravku na povrch oka, musí být osmotický tlak léčivého přípravku nižší než tlak slzní tekutiny, jinak by aplikace na povrch oční bulvy byla bolestivá. K úpravě osmotického tlaku lze použít soli - například NaCl nebo KNO₃. Důležité je sledovat také aciditu roztoku, protože optimální pH oka je v rozmezí 5,8 až 11,4. Nejvhodnější hodnota pH se pohybuje okolo 7,4, což odpovídá hodnotě pH slz. Další velmi důležitou vlastností je viskozita přípravku, která velmi úzce souvisí s účinností. Viskóznější roztoky s léčivem setrvávají déle na rohovce a tím déle léčivum působí. Viskozitu lze upravit například pomocí derivátu celulosy nebo polyvinylalkoholu. Důležité je také povrchové napětí, které lze snížit přidáním tenzidu, nejčastěji sorbitan stearátu, do roztoku. To zajišťuje lepší rozptýlení lékové formy, ale je třeba dát pozor, aby větší množství tenzidu nezpůsobovalo dráždivost. Vysoké požadavky v očních přípravcích jsou kladeny také na mikrobiální čistotu z důvodu možného vzniku bakteriální infekce, která může vést až ke ztrátě zraku. Mezi nejčastěji vyskytující se patogeny patří *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*. K zajištění mikrobiální čistoty se využívají vhodné antimikrobiální látky, které však musí být kompatibilní s obsaženými léčivy a nesmí být dráždivé, alergizující nebo poškozující epitel oční bulvy. Používá se zejména chlorid benzalkonia, bromid karbetopendecina nebo boritan fenylrtuťnatý. V očních léčích se často používají konzervanty, které sice zvyšují trvanlivost léčiva, ale mohou způsobovat mnoho vedlejších účinků, jako je například vysoušení oka [7].

1.2.2 Typy očních přípravků

Pro efektivnější léčbu očních onemocnění rozlišujeme různé formy lékového přípravku – kapky, gely, atd. Velmi účinným lubrikantem jsou umělé slzy, které ve formě kapek obsahují převážně deriváty celulózy. Oční gely obsahují zejména deriváty karbomeru, ve kterých je základem kyselina akrylová. Výhoda těchto gelů je především v delším kontaktu se sliznicí. Oční masti se od ostatních přípravků liší obsahem minerálních olejů, které po aplikaci krátkodobě zhoršují kvalitu vidění a způsobují lepkavý pocit. Z tohoto důvodu se aplikují pouze na noc [7].

Problémem nedostatečné účinnosti očních léčiv i za použití mukoadhezivních látek se zabývá mnoho vědců. V poslední době byla vymyšlena nanodestička zvaná „Nanowafer“. Destička vypadá jako průhledná čočka, na pohled zaměnitelná s kontaktní čočkou, kterou si pacient může aplikovat snadno sám na oko. Nanodestička vydrží na povrchu oka i přes mrkání, což zajistí prodloužení kontaktu léčiva se sliznicí, a tím až dvojnásobně zvýší jejich účinnost. Destička obsahuje polymer, který na sebe naváže léčivou látku, ta se z destičky postupně uvolňuje. Po skončení uvolňování veškeré léčivé látky se destička rozpustí a odplaví. Princip výroby nanodestičky je možné shrnout do několika kroků. Nejdříve se vyrobí silikonová destička, do které se pomocí elektronového litografu vytvoří nádržky, které slouží jako šablona. Na takto připravenou destičku se otiskne vrstva tvořená polydimethylsiloxanem, na které se vytvoří výčnělky. Na tuto vrstvu se nalije roztok požadovaného polymeru a při vysoké teplotě se nechá připéct. Po ztuhnutí se tato vrstva sloupne, otočí a vzniklé nádržky se naplní roztokem léčivé látky. Polymery vhodné pro výrobu nanodestičky jsou: polyvinylalkohol, polyvinylpyrolidin nebo hydroxypropyl methylcelulosa [6], [8], [25].

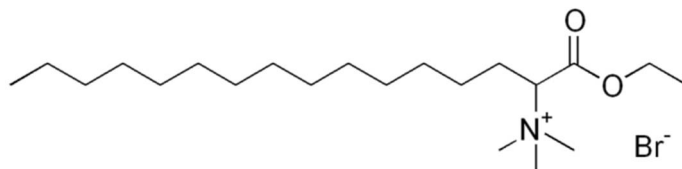


Obr. 1: Aplikace nanodestičky s léčivem pro léčbu oka [25]

1.2.3 Ophthalmo-Septonex

Ophthalmo-Septonex je léčivý prostředek vyskytující se ve formě očních kapek nebo masti. Léčba mastí je preferována zejména při aplikaci přípravku na noc z důvodu krátkodobého rozostřeného vidění. Oční kapky lze použít při běžné aplikaci kdykoliv přes den. Hlavními léčivými látkami Ophthalmo-Septonexu je zejména karbethopendeciniumbromid, ale také kyselina boritá a dekahydrát tetraboritanu sodného. Mezi pomocné látky patří: guajazulen, silice plodu fenyklu obecného pravého, dihydrát dinatrium-edetátu, ethanol 96% (V/V) a voda. Hlavní účinnou látkou je karbethopendeciniumbromid, jehož systematický název je velmi složitý: [1(ethoxykarbonyl)pentadecyl]trimethylamoniumbromid. Tato amoniiová sloučenina se používá jako antiseptikum neboli dezinfekční látka, která brání rozmnožování bakterií a některých virů. Řadí se mezi kationtové tenzidy, které ve vodném prostředí

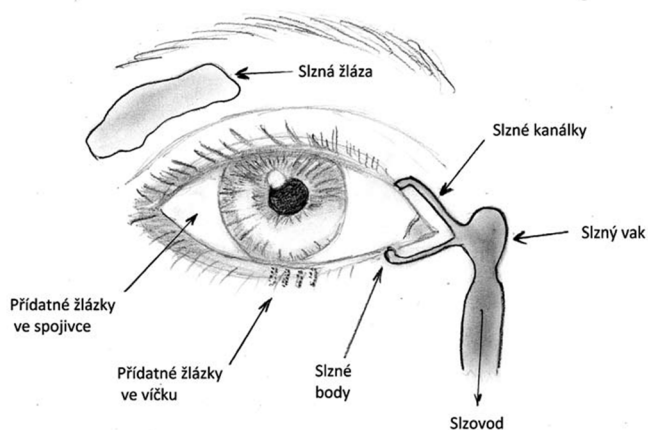
disociují na kationty, kde dusík je nositelem kladného náboje. Karbethopendeciniumbromid působí jako účinná látka jak v Ophthalmo-Septonexu, tak i v Septonexu, lišících se převážně v jeho množství. Kyselina boritá neboli borová voda a dekahydrát tetraboritanu sodného se ve velmi zředěných roztocích využívají ke zmírnění zánětlivých procesů [2], [4].



Obr. 2: Strukturní vzorec karbethopendeciniumbromidu

1.3 Slzy

Oční bulva je chráněna a vyživována slzným filmem a zvlhčována slzami. Slzy jsou velmi důležitou součástí oka. Omývají povrch oka od nečistot, prachu a udržují oko nejen vlhké, ale také přivádí do oka potřebné enzymy, minerály a imunoglobuliny. Imunoglobuliny a antibakteriální látky (například laktoferin) zajišťují, aby oko nebylo znečištěné patogeny a chrání ho proti zánětům. Tyto látky jsou na povrchu oka zdržovány oleji, vytvářenými Meibomovými žlázami, které zabráňují rychlému vypaření slz z povrchu oka. V důsledku nízké produkce Meibomových žláz slzy obsahují malé množství olejů a dochází tak k rychlému odpařování slz a slzný film se stává nesouvislým. To vede k různým druhům onemocnění [7],[8],[9].

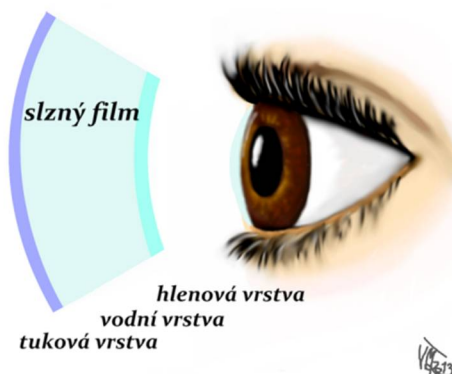


Obr. 3: Schéma produkce slz [6]

1.3.1 Slzný film

Slzný film je tenká blanka (7–10μm), která se skládá ze tří složek – vnitřní hlenové, střední vodové a vnější lipidové. Hlenová část vzniká produkcí mucinu v pohárkových buňkách spojivky a umožňuje přilnutí slz k povrchu rohovky. Tato vrstva může být narušena fyzicky, chemicky nebo nedostatkem vitamínu A. Vodnatá část je tvořena převážně slznou žlázou, umístěnou nad vnějším koutkem oka a obsahuje zejména minerály, enzymy a elektrolyty.

Poškozena bývá při tzv. Sjörgenovu syndromu pozorovanému především u žen, kdy dochází k poškození buněk slzných a slinných žláz, vedlejšími účinky léku nebo jejich dlouhodobým užíváním. Lipidová vrstva je tvořena velkým množstvím esterů, sterolů, triacylglycerolů, ale i volných mastných kyselin. Ty jsou tvořeny Meibomonovými žlázkami uloženými převážně v horním víčku. Poškození této vrstvy je způsobeno zejména dysfunkcí těchto žlázek. Každá složka slzného filmu hraje svoji důležitou roli. Lipidová složka zabraňuje odpařování a zvyšuje vlhkost, vodnatá složka zvlhčuje bulvu a hlenová složka má za úkol zadržet slzu co nejdéle na očním povrchu [7],[8],[9].



Obr. 4: Struktura slzného filmu [37]

1.3.2 Onemocnění očí

Onemocnění očí je v dnešní době jedno z nejčastějších onemocnění. Příčin vzniku očních problémů může být mnoho a mohou být také postiženy různé části oka. Mezi nejběžnější onemocnění očí patří syndrom „suchého oka“, „pink eye“, „red eye“ nebo alergické reakce. Stanovení diagnózy a stupně závažnosti lze s pomocí testů na kvalitu (Break-up time test, Vitální barvení) nebo kvantitu (Schirmerův test) slz. Schirmerův test pro zjištění kvantity slz spočívá v umístění filtračního papíru do spodního spojivkového vaku. Po 5 minutách změříme délku zvlhlého místa, čímž stanovíme množství slz. U zdravého jedince by měla přesahovat 10 mm. Break up time test hodnotí stav lipidové a hlenové vrstvy pomocí fluoresceinu, který vkápneme do oka a přes filtr sledujeme čas, za který se objeví první defekt slzného filmu. K defektu by mělo docházet zhruba po 10–15 sekundách. Pomocí vitálního barvení s indikátorem lisaminovou zelení nebo bengálskou červení dochází k obarvení místa se sníženou vitalitou tzv. poškozených oschlých míst.

V lékařské terminologii je „**suché oko**“ označeno jako „keratitis sicca“, což znamená snížení kvality či množství slz postihující rohovku a spojivky. Suché oko je způsobeno chronickým nedostatkem vlhkosti na povrchu oka a nestabilitou slzného filmu. V důsledku toho dochází ke zvýšení osmolarity a možnosti podráždění, které je způsobeno třením spojivkových řas nebo rohovkových vláček o povrch sliznice. Právě zvýšená osmolarita vede ke vzniku zánětlivých reakcí nebo k poškození epitelových či pohárkových buněk na povrchu oka. Problém suchého oka začíná drobnými oděrkami rohovky, ale může docházet až k chronickému zánětu rohovky a spojivky. V závažnějších zejména neléčených případech může dojít ke zhoršení či ztrátě průhlednosti rohovky nebo k úplné ztrátě vidění. Stupeň

postižení syndromem suchého oka se hodnotí stupnicí 1–5. První dva stupně se obejdou bez větších obtíží. Od třetího stupně dochází především k fyzickému porušení, které může vést k trvalým následkům.

Tab. 1: Stupně závažnosti onemocnění syndromu suchého oka [6]

Stupeň postižení	Klinická závažnost
1. subklinický	bez obtíží
2. slabý	svědění, světloplachost, rozostřené vidění
3. mírný	narušení epitelu rohovky
4. těžký	zkalení rohovky, vřed rohovky a leukom
5. velmi těžký	trvalé zrakové následky

Pro každý stupeň závažnosti onemocnění je vhodný jiný typ preparátu pro nejúčinnější léčbu. Pro nižší stupně poškození je vhodná léčba umělými slzami s nižší viskozitou, které nezhoršují kvalitu vidění. Při vyšších stupních onemocnění používáme kapky s vyšší viskozitou, hydrogely nebo kyselinu hyaluronovou, které mohou přechodně zhoršovat vidění (viz Tab. 2). Mezi hlavní příznaky onemocnění syndromem suchého oka patří červené oči, řezání, pálení, pocit cizího tělesa ale i slzení, které bývá způsobeno nadměrnou simulací jako ochranného mechanismu.

Tab. 2: Léčba suchého oka podle závažnosti [6]

Stupeň postižení	Typ preparátu
1. a 2. stupeň	umělé slzy nízké viskozity s obsahem polyvinylalkoholu (PVA) nebo polyvinylpyrrolidu (PVP)
3. stupeň	slzy nízké viskozity s obsahem PVA a PVP
4. stupeň	deriváty celulózy vysoké viskozity a hydrogely (karbomely)
5. stupeň	hydrogely a kyselina hyaluronová

Příčin vzniku suchého oka je mnoho. Mezi hlavní příčiny patří život v suchém nebo větrném prostředí, dlouhodobé nošení kontaktních čoček nebo dlouhé a opakované “zírání” do počítače, které způsobuje nižší frekvenci mrkání a tím i rychlejší odpařování slzného filmu. Dalším faktorem je stárí. Zejména ženy postihuje syndrom suchého oka v období menopauzy, kdy dochází ke snížení produkce kyseliny hyaluronové a tím i velkému riziku vysychání oka.

Velmi častý je vedlejší účinek léků, které mají hyposekreční účinek. To jsou léčiva na bázi antihistaminik (Zyrtec), antidepresiv (Prozac, Tofranil), anticholinergik (Atropin), antihypertenziv (Ameride). Podané léky mohou pronikat do oční tkáně prostřednictvím uveálního nebo sítnicového oběhu, protože cévnatka, skléra i řasnaté těleso mají tenké stěny propustné pro molekuly většiny léčiv. Menší molekuly lipofilních léčiv mohou volně prostupovat do komorové vody a odtud se dále šířit do avaskulárních struktur, jako jsou například čočka a rohovka. Většina nežádoucích účinků podávaných léků je mírná a při včasné intervenci reverzibilní. Způsobují zejména rozmazané vidění, zánět spojivek či alergickou reakci. Mohou se vyskytnout i závažné případy, které mohou vést k trvalému poškození zraku jako je akutní glaukomový záchvat, katarakta nebo retinopatie. Mezi nejběžněji předepisované léčiva s vedlejšími účinky na oko patří antidepresiva. Antidepresiva jsou známa pro své anticholinergní nežádoucí účinky projevující se např. rozmazaným viděním a syndromem suchého oka u více než třetiny pacientů. Kardiovaskulární léčiva obsahující betablokátory jsou široce využívány v terapii hypertenze a srdečního selhání. Při dlouhodobém užívání mohou způsobovat nebo zhoršovat syndrom suchého oka snížením sekrece slz a hladiny slzného lysozymu. Antiarytmika mění membránovou vodivost a v důsledku toho způsobují mnoho vedlejších účinků. Například při dlouhodobém užívání Amiodaronu předepisovaného při tachykardii, nacházíme téměř u všech pacientů reverzibilní depozita v rohovce a čočce. Amiodaron obsahuje látky, které působí jako blokátory draselných iontů a díky své lipofilitě dobře proniká přes slabou membránu do oka za tvorby výše zmíněných depozit. Z antibiotik za zmínku stojí přípravky obsahující sulfonamidy způsobující konjunktivitidu [7].

Další hojně se vyskytující onemocnění oka je označováno „**pink eye**“ a představuje zánět tenkého bílého krytí oka na vnitřní straně víček - spojivky. Zánět způsobuje rozšíření krevních cévek spojivky a oči vypadají jako podlité krví.

Posledním výše zmíněným postižením oka je tzv. „**red eye**“, které označuje nadměrné zvětšení krevních cévek v oku, které může mít mnoho příčin. Mezi nejčastější patří alergické reakce, únava očí, dlouhodobé nošení čoček nebo také zánět spojivek a oční infekce. Zarudnutí očí může také signalizovat vážnější onemocnění očí jako je glaukom (poškození očního nervu), katarakta (zhoršení průhlednosti čočky) nebo uveitida (zánět živnatky), které mohou vést až k trvalé ztrátě zraku. V praxi je možné krátkodobě využít bělící kapky obsahující jako účinnou látku vasoconstrictors, které způsobují smrsknutí krevních cévek. Nevýhodou těchto kapek je velmi rychlá resistance vůči účinné látce.

Alergické reakce se mohou vyskytovat i na povrchu oka. Cílovým místem je spojivka, která je v kontaktu se zevním prostředím a tudíž může být vystavena přímému působení alergenů. Alergeny mohou být sezónní (pyly) nebo celoroční (roztoči, zvířecí srst). Nejběžněji se vyskytují sezónní alergické reakce, které se projevují různými typy konjunktivity. Konjunktivita je nebezpečná spíše z hlediska frekvence výskytu než závažnosti onemocnění. Nejčastější alergická reakce je prvního typu. Při prvním setkání alergenů s antigenem dochází ke stimulaci a diferenciaci různých látek, které spouští sekreci antigenu IgE. Antigen IgE se naváže na povrch žírné buňky a při setkání s alergenem dojde k interakci a alergen se naváže na povrch buňky. To způsobuje tzv. přemostění molekul IgE, což představuje aktivační signál pro degranulaci buňky. Jejím rozpadem vznikají mediátory zánětu. Současně je aktivována fosfolipáza A, která spustí produkci kyseliny arachidinové, která je dále metabolizována. Vzniklé mediátory jsou zodpovědné za precitlivělost oka. Další projevy vznikají nadměrnou koncentrací histaminu, který byl uložen v granulích buňky. V oku se nacházejí dva

histaminidové receptory. H_1 receptor způsobuje svědění, zatímco H_2 receptor je zodpovědný za vazodilataci spojivkových cév s následným překrvením a otokem. To se projevuje zarudnutím očí, pálením či svěděním [3], [6], [7], [8].

1.4 Mukoadhezivní látky

Při přípravě léčiv pro léčbu oka se hojně využívá mukoadhezivních látek. Mukoadheze se označuje přilnutí neboli adheze biologického nebo syntetického materiálu na vrstvu slizu pokrývající slizniční epitel, v našem případě oční bulvu [5].

1.4.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Mukoadhezivní látky jsou z chemického hlediska hydrofilní makromolekuly s velkým množstvím funkčních skupin, které mohou vytvářet vodíkové vazby. Tyto látky na sebe vážou léčivou látku a mukoadhezivní vazba se vytváří ve dvou stupních. Nejprve dochází k zvlhčení a kontaktu povrchů a následně k adhezivní interakci [36]. Pro zrušení vazby mezi lékovou látkou a mukoadhezivem musí dojít k nadměrné hydrataci nebo obměně slizu či sliznice. Například oční bulva je pokryta rohovkou a proto patří mezi epitely, které vylučují slzný film na povrch sliznice. Tím se docílí řízeného uvolňování léčiva. Povrch slzného filmu je tvořen převážně glykoproteiny, které jsou rozhodující jak pro charakteristiku gelového slizu, tak i pro své kohezivní a adhezivní vlastnosti. Mukoadhezivní polymery jsou popsány čtyřmi teoriemi podle způsobu adheze ke sliznici [10]:

- Zvlhčovací teorie popisuje schopnost mukoadhezivní látky rozprostírat se na biologickém povrchu po styku s vodou.
- Difuzní teorie vyjadřuje adhezi na základě vzájemného pronikání řetězců polymeru do glykoproteinové sítě slizniční vrstvy, které se řídí zákony difuze.
- Elektronová teorie je založena na elektronické rozdílnosti ve struktuře a předpokladu přenosu elektronů mezi mukoadhezivní látkou a slizem za vzniku elektronové dvojvrstvy na rozhraní.
- Adsorpční teorie vyjadřuje výskyt interakcí jednotlivých atomů a funkčních skupin při těsném kontaktu vzájemně propletených řetězců, kdy k mukoadhezi dochází působením Van der Waalsových sil nebo tvorbou vodíkových můstků.

Proces vývoje vhodného mukoadheziva je ovlivněn mnoha faktory, které lze rozdělit do tří základních skupin [10]:

- faktory organismu, mezi které řadíme pohyby ústní sliznice, obměnu slizových molekul, chorobné stavy bukové sliznice
- vnější faktory ovlivňující pH, kontaktní čas nebo aplikační sílu
- polymerní faktory zahrnující bobtnání, rheologické vlastnosti, adhezi, kohezi, molekulová hmotnost, stupeň sesíťování, koncentrace funkčních skupin, koncentrace polymeru v systému

1.4.1.1 Proces mukoadheze

První fáze vyžaduje těsný kontakt mukoadheziva s vlhkou slizniční tkání, díky které začne mukoadhezivum bobtnat a rozprostírat se na sliznici. Bobtnání je důležité zejména pro rozpletení polymerních řetězců mukoadheziva. Tím dosáhneme maximálního možného kontaktu mezi mukoadhezivem a sliznicí.

V druhé fázi dochází k průniku rozpletených řetězců mukoadheziva do sliznice nebo interpenetraci polymerních řetězců a slizu. K interpenetraci dochází mezi postranními oligosacharidovými řetězci glykoproteinu slizu a volnými zakončeními mukoadhezivního polymeru. Kvalita interakce závisí na mobilitě řetězců, jejich bobtnavosti, pórovitosti, propletenosti, přítomnosti aditiv a kompatibilitě obou povrchů.

Ve třetí fázi dochází ke vzniku chemických interakcí mezi mukoadhezivem a slizem. Interakcemi je myšlena zejména tvorba vodíkové vazby mezi mukoadhezivem a koncovými jednotkami oligosacharidových řetězců slizu. Vytvořením adhezivních vazeb se sníží celková povrchová energie. Díky snížení povrchové energie dva původní povrchy zanikají a vzniká nové rozhraní, což způsobuje pevnější gelovou síť odolnou proti větším deformacím. To umožňuje delší setrvání mukoadhezivního systému v místě aplikace a tím zvýšení účinnosti léčiva [10],[11].

1.4.2 Vlastnosti mukoadhezivního polymeru

Mukoadhezivní proces je reverzibilní. K jeho ukončení dochází rozrušením vazby mukoadhezivum-sliznice v oblasti nejslabších kohézních sil. Pro slabá adheziva to je oblast rozhraní hydratované lékové formy a slizu, pro silná adheziva je to oblast, která se nachází až v slizové vrstvě. Pokud jsou kohézní síly dostatečně velké, dojde k ukončení adheze až biologickou obměnou slizu nebo celého povrchu sliznice. Přímou adhezi se využívá polymerů, které ve vodním prostředí tvoří hydrogely. Jedná se o hydrofilní polymery, které vyžadují vlhkost k uskutečnění svých mukoadhezivních vlastností. Vlhkost sliznice zajišťuje zejména mucin a sliny. Míra hydrofility těchto sloučenin je závislá na zastoupení polárních skupin. Mezi polární skupiny patří: -OH, -COOH, -CONH₂, -HSO₃, které odpovídají za míru interakce se slizem. Po absorpci vody do mukoadhezivní látky se léčiva navázaná ve struktuře uvolňují díky rozvolnění struktury hydrogelu. Podle chemické struktury polymeru se do skupiny tvořících hydrogely řadí polyakryláty, ethylenvinylalkohol, polyethylenoxid, polyvinylalkohol, alginát sodný a přírodní látky, jako je guma guar, guma karaya a xanthanová guma a v poslední řadě významná skupina celulosových derivátů [10].

Vhodný mukoadhezivní polymer musí vykazovat tyto vlastnosti:

- netoxičnost, nedráždivost, biologickou odbouratelnost
- dobrou rozpustnost a schopnost bobtnat
- pH vhodné pro organismus
- viskózně-elastické vlastnosti
- rychlé přilnutí ke sliznici díky adhezivním skupinám
- snadnou dostupnost, dostatečnou stabilitu
- schopnost inhibice lokálních enzymů, vlastnosti usnadňující průnik sliznicí
- vhodné prostorové uspořádání zejména sesíťovanost a molekulovou hmotnost

1.4.3 Mukoadhezivní látky s využitím v oftalmologii [10]

Mezi nejpoužívanější mukoadhezivní látky s využitím v oftalmologii patří karbomery, xanthanová klovatina, hydroxyethylcelulosa a silikony.

1.4.3.1 Karbomery

Karbomery vznikají sesíťováním akrylátů allylsacharosou nebo allylpentaerytrole, čímž vznikají látky s vysokou molekulovou hmotností. Po rozptýlení ve vodě nebo v jiném polárním rozpouštědle a následné neutralizaci bobtnají a gelovají, čímž mají vynikající zahušťující, emulgující, suspenzační a gelující vlastnosti. Vzhledem k jejich výborným mukoadhezivním vlastnostem, schopnosti řídit uvolňování léčiva a biokompatibilitě s většinou léčiv, lze karbomery využívat i v očním lékařství. Jako příklad můžeme uvést antimikrobiální kapky Fucithalmic, u kterých účinná koncentrace kyseliny fusidové přetrvává v slzné tekutině a komorové vodě nejméně 12 hodin po aplikaci.

1.4.3.2 Xanthanová klovatina

Xanthanová klovatina je přírodní polysacharid vznikající fermentací cukrů produkovaných mikroorganismem *Xanthomonascampestris*. Klovatina je dobře rozpustná za vzniku pseudoplastických roztoků vykazujících dobrou viskozitní stabilitu. Je poměrně stabilní vůči působení elektrolytů, kyselin i zásad. Vykazuje také relativně vysokou rezistenci vůči bakteriální, enzymatické a UV degradaci. Příkladem využití mukoadhezivních vlastností xanthanové klovatiny jsou moderní antibiotické oční kapky Tobrex LA, kde xanthanová klovatina zajišťuje řízené uvolňování léčiva, které umožňuje prodloužení intervalu mezi jednotlivými dávkami antibiotika ze 4 až na 12 hodinový interval.

1.4.3.3 Deriváty celulózy

Deriváty celulózy se vyskytují jako jednofázové hydrofilní hydrogely s bohatě sesíťovanou strukturou. Zahrnují deriváty iontové či neiontové. Pro větší účinnost je vhodnější využít iontové deriváty, které zajišťují lepší kontakt s membránou. Mezi nejpoužívanější deriváty patří: hydroxyethylcelulosa a hydroxypropylcelulosa.

Hydroxyethylcelulosa je polymer vznikající působením ethylenoxidu na celulózu v prostředí hydroxidu sodného. Hydroxyethylcelulosa je látka s širokým použitím v oblasti farmacie, která je rozpustná ve vodě. Její roztoky jsou stálé v širokém rozmezí pH od 2 do 12. Při vyšší koncentraci vícemocných solí než solí jednomocných dochází k jejich vysolování. Gely hydroxyethylcelulosity vykazují bioadhezivní vlastnosti, kde s rostoucí koncentrací vzrůstá adhezivita i pevnost gelu. V praxi se využívá její mukoadhezivní schopnosti v řadě očních kapek (Trusopt, Tobradex, Flarex).

Hydroxypropylcelulosa je inertní, neiontový a netoxický polymer rozpustný ve vodě, kde tvoří koloidní roztoky. V očních přípravcích se používá ke zvýšení viskozity roztoku, která s rostoucí teplotou klesá. K reverzibilnímu srážení dochází při teplotách vyšších než 40°C.

Mezi další deriváty celulózy patří hypromelosa, využívaná při nedostatečné sekreci slz, sodné soli karmelosy používaná pro úpravu viskozity a nebo hyetelosa, která se využívá jako pojivo a stabilizující látka v přípravcích pro léčbu syndromu suchého oka.

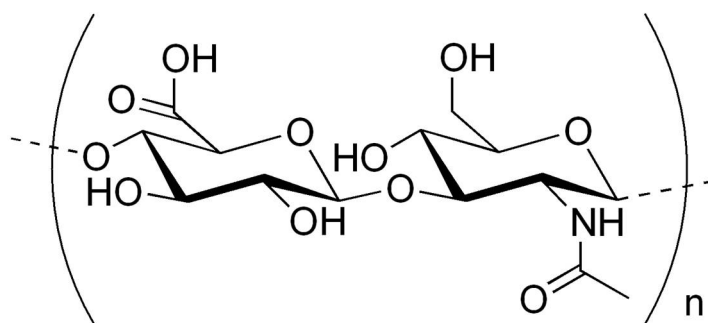
1.4.3.4 Silikony

Silikony jsou anorganicko-organické polymery s obecným vzorcem $[R_2SiO]_n$, kde R značí organický substituent. Jedná se o inertní polymery s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a širokým využitím. Organické skupiny jsou navázány na čtyřvazné atomy křemíku. Silikonové polymery jsou látky používané jako nebiodegradovatelné materiály se schopností zajistit řízené uvolňování léčiva. Při snaze o využití vlastností silikonových materiálu v mukoadhezivních lékových formách se na silikonovou kostru naroubuje některý z běžně používaných mukoadhezivních polymerů, nejčastěji ze skupiny polyakrylátu. Tímto způsobem se např. získal mukoadhezivní oční inzert s prodlouženým uvolňováním oxytetracyklinu vhodný k terapii očních bakteriálních infekcí, např. trachomu.

1.5 Kyselina hyaluronová

1.5.1 Chemické a fyzikální vlastnosti

Kyselina hyaluronová je z chemického hlediska lineární polysacharid s velkou molekulovou hmotností. Je tvořen opakujícími se jednotkami kyseliny D-glukuronové a N-acetylglukosaminu spojených střídavě glykosidickými vazbami β (1,4) a β (1,3). Axiální atomy vodíku obsažené v KH tvoří nepolární a hydrofóbní část polymeru, zatímco odvrácený řetězec tvoří hydrofilní část (Obr. 5). Díky tomuto uspořádání dojde k vytvoření spirálové konfigurace, která je velmi stabilní a vyznačuje se schopností pojmout až tisícinásobné množství vody. V závislosti na prostorovém uspořádání se KH vyznačuje rozdílnými biologickými účinky [4].



Obr. 5: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [12]

1.5.2 Výskyt a funkce

Kyselina je tvořena v plazmatické membráně nejen fibroblastů, ale i jiných buněk po přidání cukru na redukujícím konci, zatímco neredukující konec vyčnívá do pericelulárního prostoru, dále je přepravována lymfou do lymfatických uzlin nebo do krevního oběhu. Další její důležitou vlastností je schopnost bránit prostupu virů přes pericelulární matrix k buňce. Interakce mezi hyaluronovým receptorem CD44 a extracelulárním polysacharidem je spojena s pohybem a migrací buněk [36]. Hyaluronan hraje důležitou roli v průběhu vývoje a diferenciaci buněk a ovlivňuje tím jejich další regulační aktivity. KH tvoří v lidském těle

velkou část mezibuněčné hmoty. Vyskytuje se jako gelovitá spojovací hmota s vysokou viskozitou a elasticitou. Je součástí tkání pojivových, epitelových a nervových, ale velké množství kyseliny hyaluronové obsahuje také sklivec, synoviální tekutina, kůže nebo nádorové buňky. Při poškození či poranění kůže KH zabraňuje nadměrnému hromadění kolagenu v ránách, což přináší téměř bezjizvé a rychlé hojení ran a v malé míře vykazuje také analgetický účinek. V kloubní synoviální tekutině, tvořené zejména kyselinou hyaluronovou, je důležitá pro své elastické vlastnosti a v nemalé míře také při tlumení nárazů, čímž chrání klouby proti opotřebování [1].

1.5.3 Historie a využití

Kyselina hyaluronová byla objevena roku 1934 Karlem Meyerem a Johnem Palmerem v očním sklivci skotu. Do podvědomí veřejnosti se dostal spíše název hyaluronan, protože v lidském těle se vyskytuje spíše jako sodná sůl. Velmi rychle byl objeven její léčivý účinek a v 60. letech 20. století se kyselina hyaluronová začala využívat při léčbě lokálních popálenin a vředů. Od 80. let 20. století je využívána při nitroočních operacích v očním lékařství, kde se KH vpravuje injekčně do oka pro zajištění stálého tvaru čočky. Zisk KH byl zpočátku spojen s etickými problémy, protože se KH odebírala z hřebínku kohoutů a dalších zvířat, později se z tohoto důvodu začala získávat z buněčných stěn streptokoků nebo z bakterie *Escherichia coli*. Nově se jejích účinků využívá v celé řadě lékařských odvětví např. při léčbě podvrknutého kotníku, při plastice prsou nebo jako složka „anti-aging“ přípravků [1],[4].

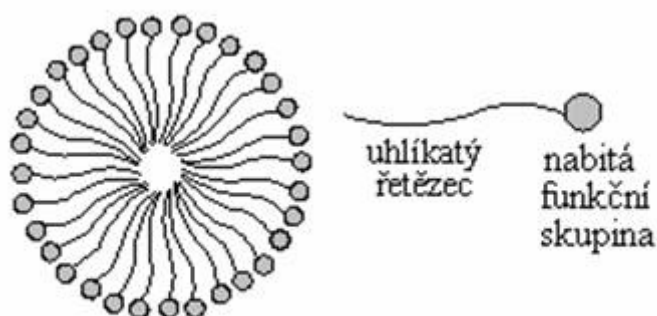
1.6 Asociativní (micelární) koloidy

Hlavní léčivou látkou očních kapek Ophthalmo-Septonex je septonex. Septonex je látka, kterou řadíme mezi tenzidy neboli asociativní koloidy. Jako asociativní koloidy, povrchově aktivní látky (PAL), či tenzidy jsou označovány ty nízkomolekulární látky, které za nízkých koncentrací poskytují pravé roztoky. Po překročení určité koncentrace se molekuly začnou shlukovat a vytvářet koloidní částice neboli micely. Fyzikální vlastnosti jsou dány (teplota, tlak, koncentrace) a díky svým schopnostem jako je smáčení, emulgace, pění a čištění mají tenzidy široké využití v praxi. Setkáváme se s nimi v běžném životě v kosmetice, medicíně nebo čistících a pracích prostředcích [14].

1.6.1 Molekulární struktura a povaha micelárních koloidů

Schopnost vytvářet micely má jen určitá skupina molekul. Jedná se o povrchově aktivní látky, které mají amfifilní neboli amfipatický charakter. Jejich molekula obsahuje skupiny, které zaručují rozpustnost díky vysoké afinitě k rozpouštědлу a současně část molekuly, která je sama o sobě v daném prostředí nerozpustná. Molekula se tedy skládá z části lyofilní (hlava), která je v daném prostředí rozpustná a části lyofobní (ocas), která je v témže prostředí nerozpustná a je příčinou vzniku micel. Lyofilní část je nejčastěji tvořena jedním nebo dvěma nasycenými uhlovodíkovými řetězci, či heterocyklickým nebo aromatickým kruhem, zatím co lyofobní část musí být tvořena minimálně 8 uhlíkovými atomy [14]. Ve zředěných roztocích se jednotlivé molekuly shromažďují na mezifázovém rozhraní. Hnací silou je snaha omezit kontakt mezi povahově rozdílnými molekulami. Tím dochází ke snížení povrchového napětí rozpouštědla, a proto jsou tyto látky označovány jako povrchově aktivní látky. Se zvyšující se

koncentrací dochází k postupnému nasycení mezifázového povrchu molekulami tenzidů. V určitém bodě dochází k přesycení povrchu, molekuly začnou agregovat a vznikají micely [15].



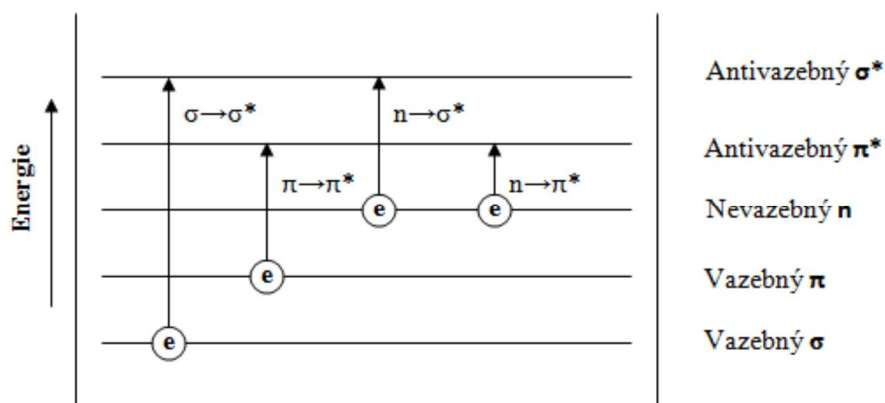
Obr. 6: Struktura micely a molekuly tenzidu [38]

1.6.2 Kritická micelární koncentrace

Při překročení určité hranice koncentrace dochází ke vzniku koloidních útvarů neboli micel. Tato koncentrace je označována jako kritická micelární (CMC) a je považována za nejvyšší možnou koncentraci, při které se tenzid vyskytuje ve formě monomerních jednotek. Pohybuje se v rozmezí 10^{-3} až 10^{-5} mol·dm⁻³. Při vyšší koncentraci je tenzid přítomen ve formě micel, což způsobuje změnu fyzikálně chemických vlastností roztoků [17].

1.7 UV-VIS spektrometrie

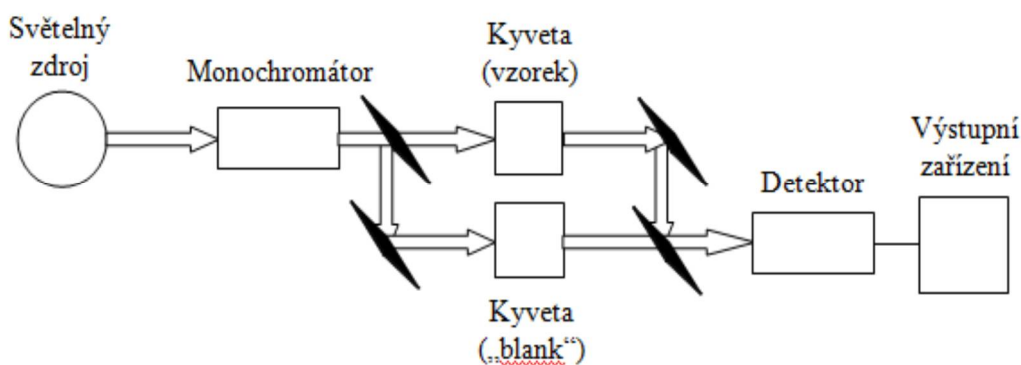
UV-VIS spektrometrie je velmi nenáročná, rychlá, ale zároveň velmi citlivá metoda, která funguje na principu interakce elektromagnetického záření s hmotou. Jedná se o spektrální metodu, kde energie je absorbována vazebnými i nevazebnými molekulárními orbitály látek, čímž se řadí do kategorie molekulové absorpční spektrometrie. K absorpci záření dochází v oblasti ultrafialového a viditelného světla (200–800nm). Při absorpci dochází ke změně energetického stavu (vibrační a rotační stav). Molekuly ze základní elektronové i vibrační hladiny jsou excitovány a valenční a nevazebné elektrony přecházejí do vyšších energetických hladin. Po velmi krátkém časovém úseku (zhruba 10^{-9} s) dochází k zářivému či nezářivému přechodu elektronů zpět na základní nebo nižší hladinu. Na výsledném spektru se tedy podílejí nejen elektronové hladiny, ale také vibrační a rotační podhladiny [18]. Při absorpci UV-VIS záření může docházet k 3 typům elektronových přechodů - intramolekulové, přechody přenosu náboje nebo přechody d-d. Intramolekulové přechody nastávají mezi vazebnými a antivazebnými orbitály ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ a $\pi \rightarrow \pi^*$) a mezi nevazebnými a antivazebnými orbitály ($n \rightarrow \sigma^*$ a $n \rightarrow \pi^*$).



Obr. 7: Elektronové přechody v molekule

Přenos náboje je založen na absorpci anorganických látek a tvorby komplexu přenosu náboje, kdy jedna složka musí být elektron donorní a druhá elektron akceptorní. Absorpce elektromagnetického záření způsobí přenos elektronu z orbitalu donoru na orbital akceptoru [19]. Přechod d-d se uplatňuje zejména mezi kovy, kdy dochází k přenosu elektronu z d orbitalu na d orbital jiného kovu. Přechod d-d je však symetricky zakázán a proto se projevuje velmi nízkou intenzitou.

K vyhodnocení metody je využíván dvoupaprskový UV-VIS spektrometr, který je založen na porovnávání aktuálního vzorku s blankem za stávajících podmínek. Zdrojem světla je pro VIS oblast wolframová lampa, pro UV oblast pak lampa deuteriová. Světlo ze světelného zdroje dopadá na monochromátor, pomocí rotačních zrcadel je rozděleno na dva svazky, které následně prochází kyvetami. Po průchodu paprsku vzorkem dopadne světlo na detektor. Výstupní zařízení zobrazuje absorpční spektrum.



Obr. 8: Schéma dvoupaprskovitého spektrometru

1.7.1 Kyselina pikrová

Kyselina pikrová, strukturním názvem trinitrofenol je světle žlutá krystalická látka, bez zápachu. Z důvodu zvýšeného rizika výbušnosti po vyschnutí je uchovávána pod vodou. Velmi ochotně tvoří soli s mnoha prvky, tzv. pikráty, které jsou velmi citlivé na teplo, tření a

nárazy, mnohem více než samotná kyselina. V praxi se vyrábí nitrací 4-hydroxybenzen-1,3-disulfonové kyseliny nebo fenolu. Při zahřátí snadno vybuchuje, čehož se využívá při výrobě trhavin. V analytické chemii se používá jako kolorimetrické nebo testovací činidlo např. při identifikaci alkaloidů nebo kolorimetrickému stanovení cukrů v krvi. V běžném průmyslu je využívána v kožedělném a textilní průmyslu nebo medicíně. Stanovení v UV-VIS spektrometrii je založeno na tvorbě oranžovo-žlutých komplexů, kdy intenzita zbarvení je přímo úměrná koncentraci stanovované látky ve vzorku [20].

1.8 Membránové separační metody

Membránové procesy jsou založeny na separaci přes polopropustnou membránu. Tato membrána je propustná jen pro nízkomolekulární látky, zatímco makromolekulární látky membránou neprojdou. Metoda je využívána k hrubé separaci molekul např. separaci biopolymerů.

1.8.1 Dialýza

Dialýza je separační a fyzikální proces, který spočívá v difúzním toku rozpuštěných látek přes membránu. Dialýza může probíhat buď mezi dvěma roztoky o různé koncentraci nebo mezi roztokem a čistým rozpouštědlem. Směr separace probíhá buď z koncentrovanějšího roztoku do roztoku s nižší koncentrací nebo z rozpouštědla, tzn. ve směru koncentračního spádu. Přes membrány mohou difundovat jen látky s menšími rozměry než je velikost póru. Větší látky zůstávají uvnitř membrány. Ve chvíli vyrovnaní koncentrací na obou stranách membrány dochází k zastavení dialýzy. Membrány jsou dnes již komerčně dostupné umělé membrány, většinou ve tvaru trubice s různou velikostí pórů. Dialýza se využívá k přečištění roztoku nebo ke studiu změny roztokových vlastností. Rychlost dialýzy je ovlivněna zejména faktory souvisejícími s pohybem molekul jako je teplota, velikost membrány a jejich pórů a koncentrační gradient. Rychlost dialýzy lze zvýšit také mícháním, které zabraňuje tvorbě mikroprostředí (Nerstova vrstva). Maximální velikost pórů membrány (MWCO) označuje molekulovou hmotnost, při které již 90% molekul neprojde póry membrány [21],[22].

1.8.1.1 Membrány

V dnešní době jsou používány především syntetické membrány s vyhovujícími chemickými i fyzikálními vlastnostmi. Dialyzační membrány mohou být tvořeny organickými nebo anorganickými sloučeninami. Anorganické membrány se vyznačují vyšší odolností, zejména proti teplotě a tlaku. Podle způsobu výroby lze membrány dělit na porézní či neporézní. Porézní membrány separují na základě velikosti pórů, které umožňují také konvektivní tok tekutiny. Na dělicí schopnost nemá vliv materiál. Membrány s neporézní strukturou separují na základě difuze a dialýza je zásadně ovlivňována materiálem membrány. Nejčastěji jsou využívány organické membrány s neporézní strukturou. Pro laboratorní dialýzu jsou využívány membrány vyrobené z celulózy. Mezi nedůležitější vlastnosti separačních membrán patří permeabilita, selektivita a rejekční faktor. Permeabilita neboli propustnost složek dělených směsí, je definována jako tok složky jednotkovou plochou membrány při jednotkové hybné síle přes jednotkovou tloušťku membrány. Selektivita nám

udává schopnost oddělovat složky dělených směsí. Rejekční faktor udává míru zadržení složky u vstupního povrchu membrány. Z rejekčního faktoru vyplývá, že membrána propouští všechny složky s nižší molární hmotností než je jeho hodnota [22],[23].

1.9 Měření velikosti částic

Pro měření velikosti částic bylo využito přístroje Zetasizer Nano ZS, který využívá dynamického rozptylu částic – DLS (Dynamic Light Scattering). Tato metoda sleduje Brownův pohyb částic, což je pohyb částic, který vzniká díky náhodné srážce částice s molekulou kapaliny. Důležitým poznatkem je fakt, že malé částice se pohybují rychleji než velké částice. Vztah mezi velikostí a rychlostí částice je definovaný pomocí Stokes-Einsteinově rovnice. Velikost částic je měřena na principu osvětlení částic laserem a analyzováním fluktuací intenzity rozptýleného světla. Rozptýlené světlo snímáme pomocí nastavitelné optiky pro různě velké částice [27].

1.10 Náboj částic – zeta potenciál

Zeta potenciál se měří u nabitých částic a vyjadřuje zejména stabilitu koloidního systému. Nabitá molekula kolem sebe tvoří elektrickou dvojvrstvu. Dvojvrstva se skládá z vnitřní – Sternovy vrstvy, ve které jsou ionty pevně vázané a vnější neboli difúzní vrstvy, ve které jsou ionty vázány pouze slabě. Uvnitř difúzní vrstvy se nachází teoretická hranice, která se označuje jako rovina skluzu. Za touto hranicí ionty již netvoří stabilní jednotku. Při pohybu molekuly se částice za touto hranicí s molekulou nepohybují. Potenciál na této hranici se nazývá zeta potenciál. Za stabilní systém se považují systémy, které mají hodnotu potenciálu vyšší než 30mV nebo menší než –30mV. Systémy s nulovým zeta potenciálem jsou považovány za nejméně stabilní. Bod nulového zeta potenciálu se nazývá izoelektrický bod [28].

1.11 Viskozita

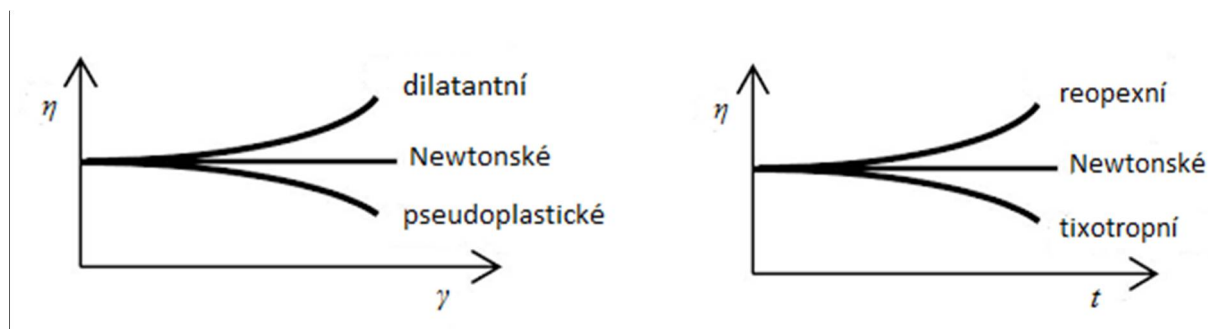
Kapaliny jsou látky, které tečou – tj. deformují se účinkem vnější síly. Rychlost toku závisí na velikosti vnějších sil, působících proti toku. Základním vztahem definujícím viskozitu je Newtonův zákon, který stanovuje vztah mezi smykovým napětím τ a rychlostí smykové deformace γ a je rovna gradientu rychlosti mezi vrstvami kapaliny. Dynamická viskozita η zde vyjadřuje konstantu úměrnosti. Znění zákona je uvedeno v následující rovnici:

$$\tau = \eta \cdot \frac{dv}{dy} = \eta \cdot \gamma \quad (1)$$

Při malých rychlostech proudění dochází ke smykové deformaci, která charakterizuje smykové napětí. Pokud kapalina proudí laminárně, vzniká mezi vrstvami tečné napětí, které je způsobeno působením mezimolekulárních sil. Podle způsobu měření rozlišujeme viskozitu dynamickou, která je definována Newtonovou rovnicí a kinematickou viskozitu, které je podílem dynamické viskozity η k hustotě ρ kapaliny. Kinematická viskozita je tedy dána následující rovnicí:

$$v[m^2 / s] = \frac{\eta}{\rho} \quad (2)$$

Látky, které se při působení smykového napětí chovají podle Newtonova zákona, se označují jako newtonské. Hodnota jejich viskozity je nezávislá na rychlosti smykového tření a čase. Kapaliny, které se nechovají podle Newtonova zákona se nazývají nenewtonské. Jejich viskozita může v závislosti na smykovém napětí klesat – kapaliny pseudoplastické, či vzrůstat – kapaliny dilatantní. Dále rozlišujeme ještě nenewtonské kapaliny, u kterých se viskozita mění s dobou působení. Pokud viskozita s časem klesá, jedná se o kapaliny tixotropní. Jestliže s časem viskozita stoupá, nazýváme tyto kapaliny reopexní [29],[30].



Obr. 10: Závislost viskozity na smykové deformaci

Obr. 9: Závislost viskozity na čase

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Za posledních pár desítek let bylo prozkoumáno nespočet polymerních systémů, které by mohly najít uplatnění zejména v lékařství či farmacii. V dnešní době obrovský „boom“ zaznamenala kyselina hyaluronová, která nabízí velmi široké uplatnění. Jedná se o látku, která je netoxická, protizánětlivá, tělu vlastní a biologicky odbouratelná látka. Výzkum této kyseliny se provádí zejména v oblasti cílených nosičů léčiv s prodlouženým uvolňováním. Pro ty je významná vysoká afinita HyA na receptor CD44 [33].

Thalberg a Lindmant [31] se ve své práci zaměřili na interakci hyaluronanu s kationtovými tenzidy v závislosti na délce jejich alkylových řetězců. Pro zjištění chování systému hyaluronan-kationaktivní tenzid využili následujících metod: NMR, vodivost, fázová separace a solubilizace barviv. Po vyhodnocení výsledků bylo prokázáno, že vazba mezi hyaluronanem a tenzidem je slabší než s jiným polyelektrolytem. Dále bylo zjištěno, že k navázání tenzidu na hyaluronan je třeba velmi nízká koncentrace tenzidu c_1 , avšak podmínkou je minimálně deset uhlíků v alkylovém řetězci. Tenzidy s nižším počtem uhlíků tvoří micely, protože je to energeticky výhodnější. Hodnota koncentrace tenzidu c_1 s rostoucím počtem uhlíků v řetězci klesá a nachází se pod CMC.

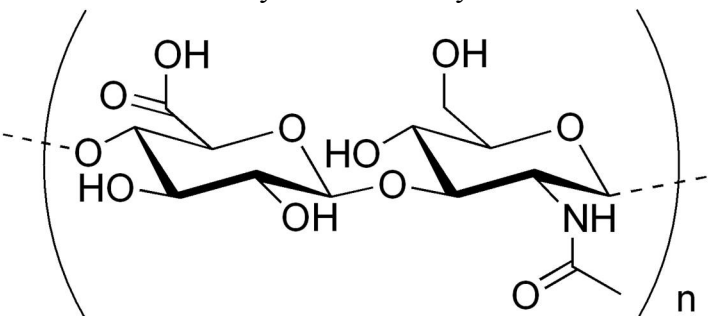
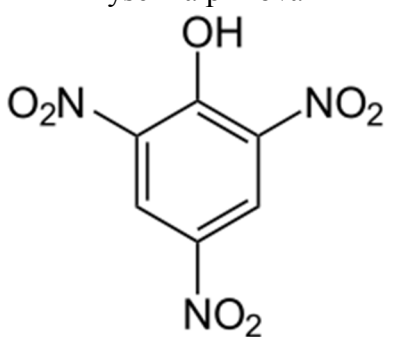
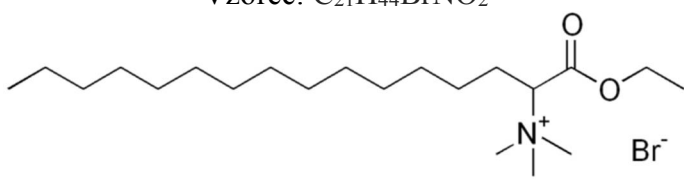
Skupina vědců *Lei, Rahim, Quinn a Segura* [32] popisuje proces známý jako „nanočásticová enkapsulace“. V tomto procesu dochází k začlenění koncentrované, ale neagregované nanočástice do různých struktur gelu např. kyseliny hyaluronové a fibrinového hydrogelu. Bylo prokázáno, že tyto gely s koncentrovanými a neagregovanými polykomplexy mohou být vhodné pro genové dodání in-vivo a in-vitro. Ve studii byla srovnávána velikost polykomplexů fibrinu bez a v přítomnosti HyA pomocí DLS – dynamického rozptylu světla. Bylo zjištěno, že DNA/PEI polykomplexy se pohybovaly v rozmezí 50-100nm, kdežto v přítomnosti 1% HyA byla velikost okolo 1 μ m.

O dialýze pojednává studie Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carries vědců *Jones a Leroux* [34]. Dialýza zde byla použita pro stanovení zachycení léčiv v micelách. Metoda se skládá z přenesení léčiva a kopolymeru v rozpouštědle, ve kterém jsou obě látky rozpustné do selektivního rozpouštědla, ve kterém se rozpustí pouze hydrofilní část polymeru. To způsobí tvorbu micel, do kterých se uzavře nerozpustné léčivo.

Wurster a Werawatganone [35] studovali chování systému neionogenního polymeru HPMC-hydroxypropylmethyl celulosy, s kationaktivním tenzidem CTAB. Pro měření interakcí HPMC-CTAB byla zvolena rovnovážná dialýza. Výsledky ukazují, že bez přítomnosti polymeru byly koncentrace po určité době vně a uvnitř membrány vyrovnány, zatímco za přítomnosti různých stupňů HPMC o koncentraci 0,02% byla dialýza mnohem pomalejší a konečné koncentrace uvnitř membrány byly mnohem vyšší (poměry koncentrací okolo 2). Tím byly dokázány interakce mezi CTAB a HPMC.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

<p>Hyaluronan sodný</p>  <p>1500-1750kDa, Contipro Biotech s.r.o, č.š. 213-5226</p>
<p>Kyselina pikrová</p>  <p>Vzorec: $C_6H_3N_3O_7$; čistota $\geq 98\%$ Molekulární hmotnost: 229,1 g/mol Sigma Aldrich; č.š. STBD2664V</p>
<p>Chloroform 99%</p> <p>Vzorec: $CHCl_3$</p> <p>Molekulární hmotnost: 119,38 g/mol PENTA s.r.o, č.š. 2003190315</p>
<p>Septonex</p> <p>Vzorec: $C_{21}H_{44}BrNO_2$</p>  <p>Molekulární hmotnost: 422,48 g/mol GNB chem a.s., č.š. 910SEP002</p>

3.2 Příprava zásobních roztoků

3.2.1 Zásobní roztok 1mM Septonexu

Na analytických vahách bylo naváženo 0,42248g septonexu na vznik jednoho litru 1mM zásobního roztoku. Následně byla látka kvantitativně převedena do odměrné baňky a doplněna po rysku ultračistou, deionizovanou vodou ze systému Purlab. Roztok byl promíchán pomocí magnetické míchačky.

3.2.2 Zásobní roztok 0,01% kyseliny pikrové

Do zcela čisté zásobní láhve bylo na analytických vahách naváženo požadované množství kyseliny pikrové, kdy její hmotnost nesměla přesáhnout 0,03g na 100ml. Navážka byla odebírána co nejvíce ze dna, aby byla získána převážně kyselina a ne voda. Kyselina pikrová je výbušná látka, kterou je nutné uchovávat pod vodou. Při manipulaci s kyselinou pikrovou je nutné dodržovat bezpečné podmínky – použití rukavic. Navážka byla ihned doplněna odpovídajícím množstvím chloroformu, řádně promíchána a uzavřena pomocí parafilmu.

3.2.3 Zásobní roztok hyaluronanu

Do suché vialky bylo na analytických vahách naváženo potřebné množství hyaluronanu sodného na výslednou koncentraci 2g/l a doplněno na požadovaný objem. Roztok byl ponechán řádně promíchat.

3.3 Příprava vzorků

3.3.1 Příprava vzorků Septonexu

Byla připravena vhodná kalibrační řada, která obsahovala 10 vzorků. Do suché vialky bylo napipetováno odpovídající množství zásobního 1mM roztoku septonexu a doplněno na výsledný objem 5ml. Připravený vzorek byl nechán minimálně 24hodin třepat.

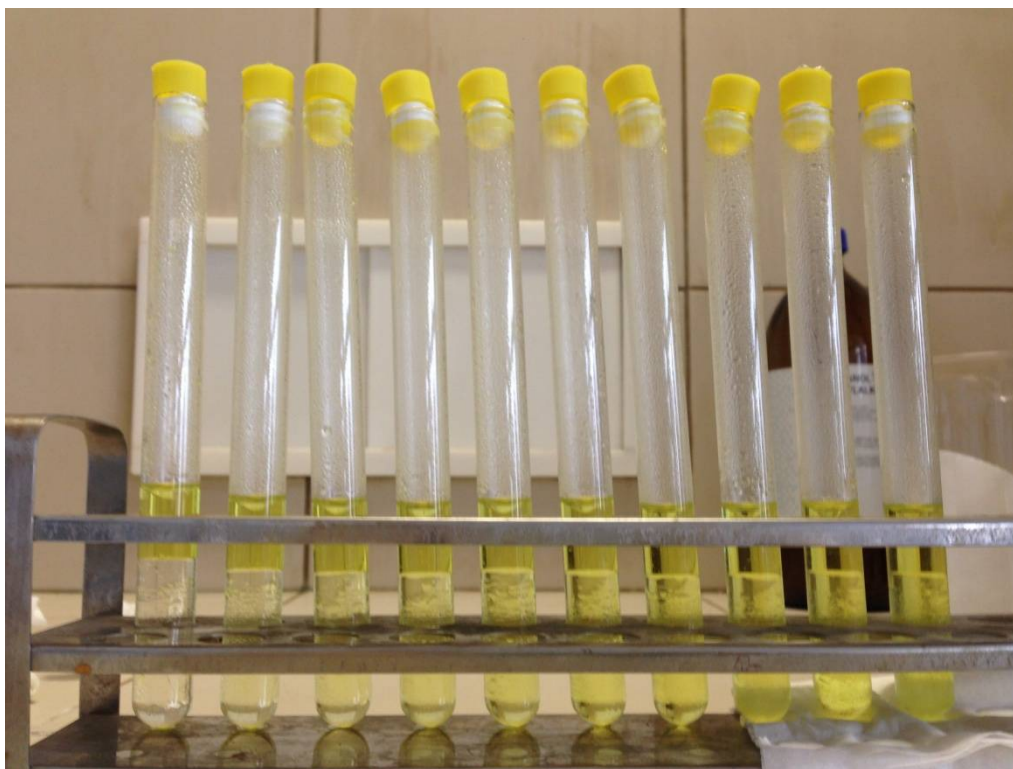
3.3.2 Příprava vzorku Ophthamo-Septonexu s přídavkem hyaluronanu

Postupným přídavkem bylo určeno, že maximální možná koncentrace hyaluronanu v očních kapkách Ophthamo-Septonex je 0,028g/l. Do suché vialky bylo napipetováno 5ml očních kapek a pomocí automatické pipety přidáno 70 μ l roztoku hyaluronanu o koncentraci 2g/l. Vzorek byl použit pár hodin po přípravě.

3.4 Modifikovaná Mahrousova metoda-příprava vzorků pro měření

Postup metody byl nastudován podle práce Wurster a Werwatganone [25]. Veškerá práce byla prováděna v digestoři a v rukavicích a ochranných brýlích. Do zcela suché zkumavky byly pomocí automatické pipety napipetovány 3 cm³ vzorku a poté bylo přidáno dvojnásobné množství 0,01% roztoku kyseliny pikrové v chloroformu, v našem případě 6 cm³. Zkumavka byla ihned uzavřena zátkou opatřenou teflonovou páskou. Zkumavka byla 1 minutu intenzivně protřepávána a následně přibližně 2 minuty ponechána v klidu pro dobré oddělení fází. Pomocí skleněné pipety o objemu 5ml byla odebrána horní (vodná) fáze systému.

Následně byla dolní (chloroformová) fáze přefiltrována přes filtrační papír za normálního tlaku. První 1–2 cm filtrátu byly odebrány do připravené odpadní kádinky a zlikvidovány. Zbylý roztok byl jímán do označené vialky a ihned uzavřen. Takto připravený vzorek byl proměřen co nejdříve na UV-VIS spektrofotometru.



Obr. 11: Separace fází po extrakci

3.4.1 Měření

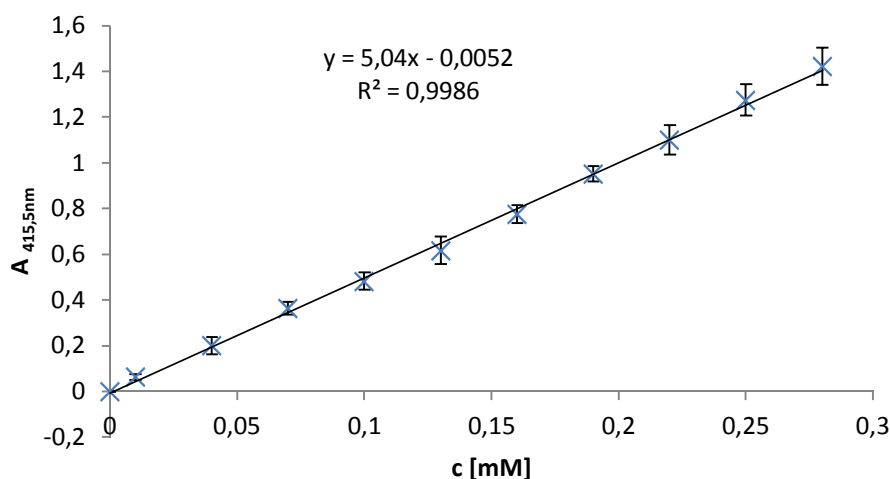
Pro stanovení kalibrační řady i pro všechny vzorky obsahující septonex, byla použita modifikovaná Mahrusova metoda vyhodnocena pomocí UV-VIS absorbní spektrometrie. K vyhodnocení byl použit dvoupaprskový UV-VIS spektrometr HITACHI U-3900H, který je založen na porovnávání vzorku s blankem za stávajících podmínek. Zdrojem světla je pro VIS oblast wolframová lampa, pro UV oblast pak lampa deuteriová. Všechny vzorky byly proměřeny v rozmezí vlnové délky 300–700nm. Pro stanovení kalibrační křivky odečítáme hodnoty při 415,5nm.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem práce je naučit se modifikovanou Mahrousovu metodu a pomocí dialýzy zjistit, zda dochází k interakci hyaluronan-Septonex v očních kapkách. Dále ověřit míru interakce a stabilitu komplexu.

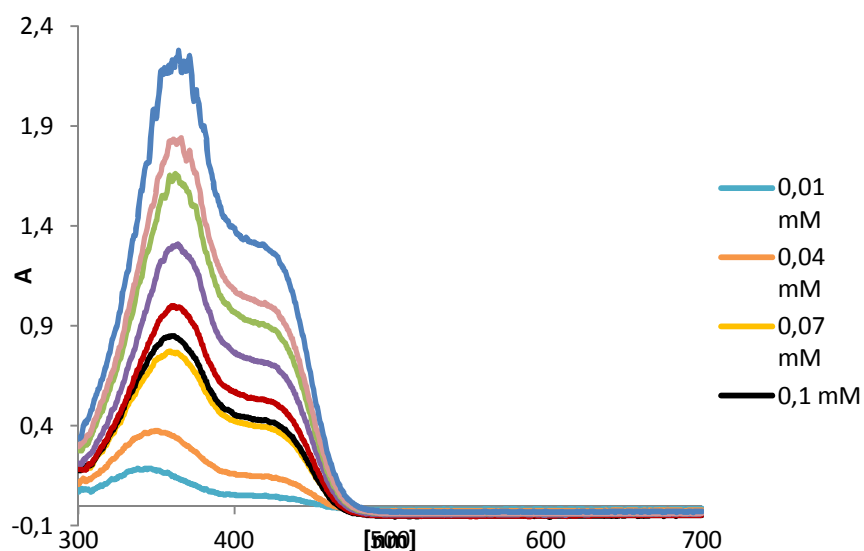
4.1 Kalibrační křivka Septonexu

Pro popis a možnost stanovení výsledků dalších naměřených dat byly sestaveny kalibrační křivky. Graf 2 zobrazuje absorpční spektrum koncentrační řady septonexu v komplexu s kyselinou pikrovou vyextrahovaného do chloroformu. Z naměřených hodnot je vidět, že se zvyšující se koncentrací tenzidu stoupá absorbance, což potvrzuje platnost Lambert–Beerova zákona. Maximum absorpčního spektra vzorků se pohybuje okolo hodnot 355–364nm. Pro další vyhodnocování naměřených dat byla použita vlnová délka 415,5nm, kdy jsou absorbance nižší [46]. Díky tomu mohou být vyhodnoceny i vzorky s vyšší koncentrací. Pro dobrou interpretaci výsledků by absorbance vzorků při dané vlnové délce neměla o moc překročit rozmezí hodnot 0,1–1,0.



Graf 1: Kalibrační přímka septonexu – průměrná hodnota

Kalibrační přímka byla stanovena z 3 měření aritmetickým průměrem pomocí programu EXCEL.



Graf 2: Absorbční spektrum Septonexu v chloroformu – 1. měření

4.2 Zjištění koncentrace pro dialýzu

Aby mohla být provedena dialýza, musela být nejprve zjištěna nejvyšší možná koncentrace, při které se ještě hyaluronan nevysráží z roztoku Ophthalmo-Septonexu. To bylo zjišťováno pomocí postupného přidavku roztoku hyaluronanu o koncentraci 2g/l do 5ml očních kapek Ophthalmo-Septonex a sledování tvorby zákalu.(viz Tab. 3) Mezi každým přidavkem byl roztok míchán 5 minut na míchačce.

Tab. 3: Sledování vlivu přidavku hyaluronanu

přídavek Hya		Pozorování roztoku kapek
přídavek [μl]	celkem [μl]	
10	10	čirá
10	20	čirá
10	30	čirá
10	40	čirá
10	50	čirá
10	60	čirá
10	70	lehoulinký zákal
10	80	lehký zákal
10	90	lehký zákal
10	100	lehký zákal
20	120	lehký zákal
20	140	lehká zákal, malé množství sraženin
20	160	lehká zákal, malé množství sraženin
30	190	zákal, sraženiny
30	220	zákal, sraženiny
50	270	zákal, sraženiny

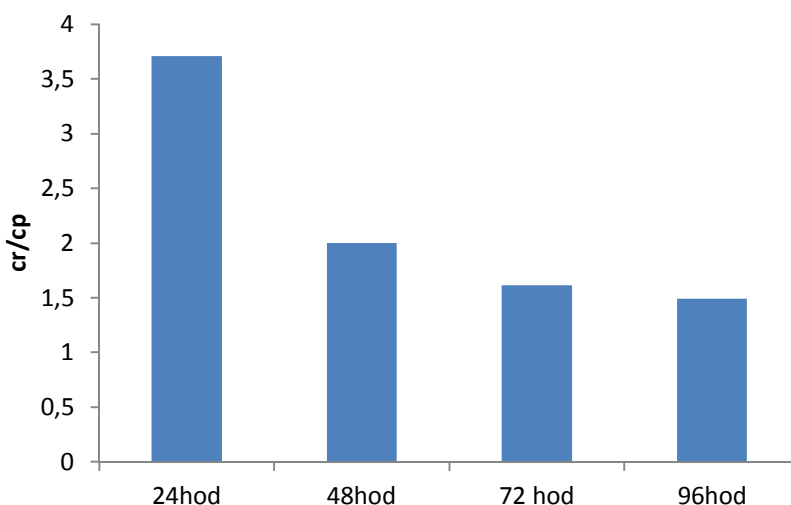
Pro dialýzu byla vybrána koncentrace, která vznikla po přidání 70 μ l roztoku hyaluronanu, což odpovídá koncentraci 0,028g/l hyaluronanu v očních kapkách Ophthalmo-Septonex.

4.3 Dialýza

Dialýza byla provedena pro systém Ophthalmo-Septonex-voda a pro systém Ophthalmo-Septonex-Hya. Dialyzační membrána byla ponechána se hydratovat 10minut ve vodě ze systému Purlab, poté byla vložena do kádinky s 65ml vody. Dovnitř membrány bylo napipetováno 13ml vzorku. Odběry byly prováděny z prostředí uvnitř a vně membrány, tzv. retentátu a permeátu v 24hodinových intervalech po dobu 4dnů.

4.3.1 Dialýza systému Ophthalmo-Septonex a hyaluronan

V tomto experimentu vzorek obsahoval oční kapky Ophthalmo-Septonex a hyaluronan o koncentraci, která byla zjištěna metodou postupného přidavku (výsledná koncentrace Hya v Ophthalmo-Septonexu je 0,028g/l). Výsledný vzorek obsahoval 13ml očních kapek, do kterých bylo přidáno 182 μ l roztoku hyaluronanu ($c=2$ g/l) a řádně promícháno na míchačce. Připravený vzorek byl nechán dialyzovat.



Graf 3: Graf přestupu tenzidu z retentátu do permeátu

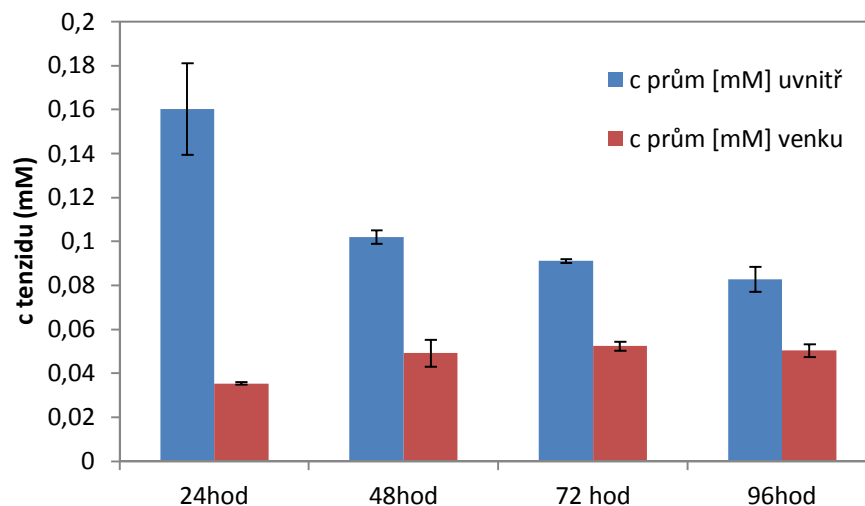
Pro výpočet koncentrace tenzidu v permeátu (cp) a retentátu (cr) použijeme rovnici regrese z kalibrační přímky Septonexu (viz odstavec 4.1).

Rovnice regrese

$$y = 5,04 \cdot x - 0,0052$$

Za hodnotu y dosadíme hodnotu absorbance, kterou jsme změřili pomocí spektrofotometru a vyjádříme proměnnou x, která je rovna koncentraci. Z toho plyne, že koncentraci retentátu spočítáme pomocí vzorce $c_r = \frac{A + 0,0052}{5,04}$, kde A je absorbance u vzorku odebraného uvnitř

membrány. Pro výpočet koncentrace v permeátu použijeme obdobný vzorec $c_p = \frac{A + 0,0052}{5,04}$, kde A je absorbance u vzorku odebraného z vnějšího prostředí.

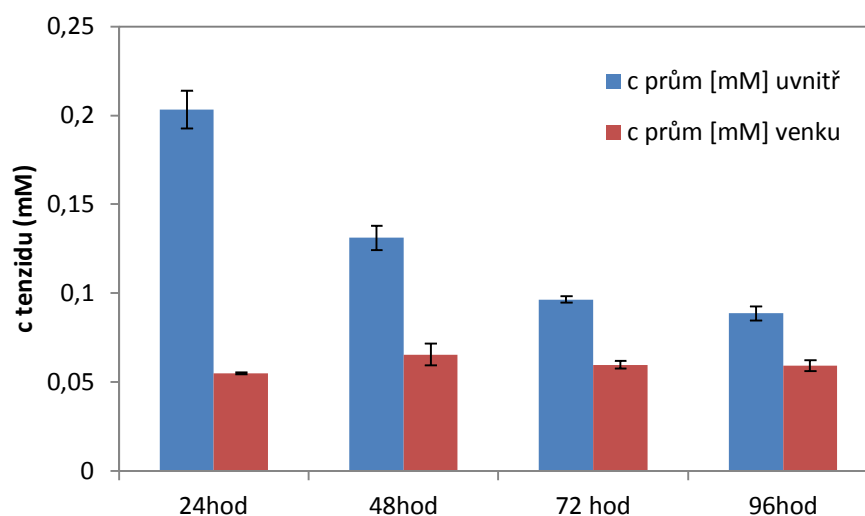


Graf 4: Graf průběhu dialýzy kapek s Hya

Z grafů lze vidět, že tenzid pomalu přecházel z membrány do vnějšího prostředí, ale ani po 4 dnech nedošlo k vyrovnání koncentrací v retantátu a permeátu (Graf 3 a Graf 4). To znamená, že poměr c_r/c_p se ani po 96 hodinách neblíží hodnotě 1.

4.3.2 Dialýza Ophthalmo-Septonex-voda

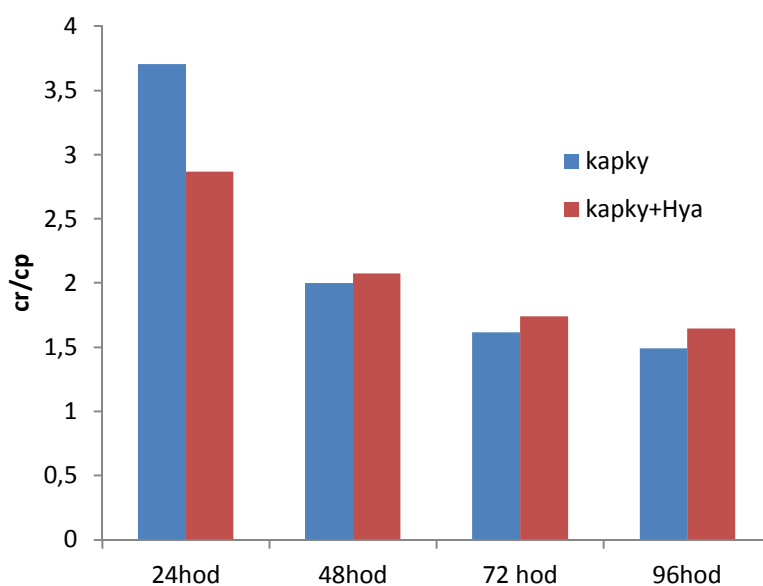
Obdobný experiment byl proveden se systémem Ophthalmo-Septonex a voda za stejných podmínek, aby bylo možné experimenty porovnat. Vzorek pro tento experiment obsahoval 13ml očních kapek Ophthalmo-Septonex.



Graf 5: Průběh dialýzy očních kapek

4.3.3 Vyhodnocení

Předpokladem pro tento experiment bylo, že v systému Ophthalmo-Septonex+Hya se vyskytují malé micely na řetězcích hyaluronanu, čímž by mělo dojít k zpomalení nebo v ideálním případě úplnému zabránění přestupu přes dialyzační membránu. Z porovnání průběhu obou dialýz můžeme vidět, že u kapek+Hya byla větší koncentrace retentátu i po 96 hodinách než u samotných kapek. To bylo způsobeno přítomností tenzidu. Z toho lze předpokládat, že došlo k interakci Hya se Septonexem. V tomto měření nebyl odhalen vznik sraženiny, protože vzniklá sraženina nebyla v membráně dobře viditelná a při odběru sraženina zrovna nebyla odebrána nebo byla vyhodnocena za znečištění a při stanovení koncentrace pomocí Mahrousovy modifikované metody odfiltrována.



Graf 6: Vyhodnocení dialýzy

4.4 Experiment s rohovkou z prasečího oka

Z prasečího oka byla odebrána rohovka, což je blanka, která kryje a chrání oko před vnějším prostředím (viz kapitola 1.1).

Vypreparovaná rohovka byla rozdělena na 4 části a každá část zvážena (oko 1 a 2). Z důvodu vzniklého velmi malého kousku rohovky po rozčtvrcení, byla u dalších prasečích očí rohovka rozdělena pouze na dvě části. Část rohovky byla ponechána buď v roztoku Ophthalmo-Septonexu s přídavkem hyaluronanu ($c=0,028\text{g/l}$) nebo pouze samotném Ophthalmo-Septonexu. Vzorek s přídavkem hyaluronanu byl složen z 5ml kapek a $70\mu\text{l}$ hyaluronanu ($c=2\text{g/l}$). Následně byl promíchán na míchačce a použit. Část rohovky byla na 5 minut ponořena do vzorku a po lehkém oklepaní zvážena. Následně byl porovnáván přírůstek hmotnosti rohovky ponořené do roztoku s Hya a bez něj. Zvážené přírůstky můžeme vidět v Tab. 4. Průměrné hodnoty i se směrodatnými odchylkami byly spočítány v Tab. 5.

Tab. 4: Přírůstek hmotnosti rohovky

Oko	Rohovka [g]	Přírůstek hmotnosti v Opth-Sept [g]	Rohovka [g]	Přírůstek hmotnosti v Hya+Opth-Sept [g]
1	0,0701	0,029	0,0768	0,03
1	0,075	0,041	0,084	0,035
2	0,071	0,02	0,079	0,026
2	0,048	0,015	0,074	0,038
3	0,1204	0,0185	0,1088	0,049
4	0,0849	0,024	0,1115	0,042
5	0,1815	0,0321	0,1134	0,0422
6	0,105	0,035	0,1273	0,0498
7	0,1288	0,0309	0,1177	0,0483
8	0,0792	0,0361	0,0982	0,0548

Tab. 5: Vyhodnocení

	v Opth-Sept [g]	v Hya+Opth-Sept [g]
průměrný přírůstek z 2.sady.	0,0294	0,0477
směrodatná odchylka	0,0062	0,0045

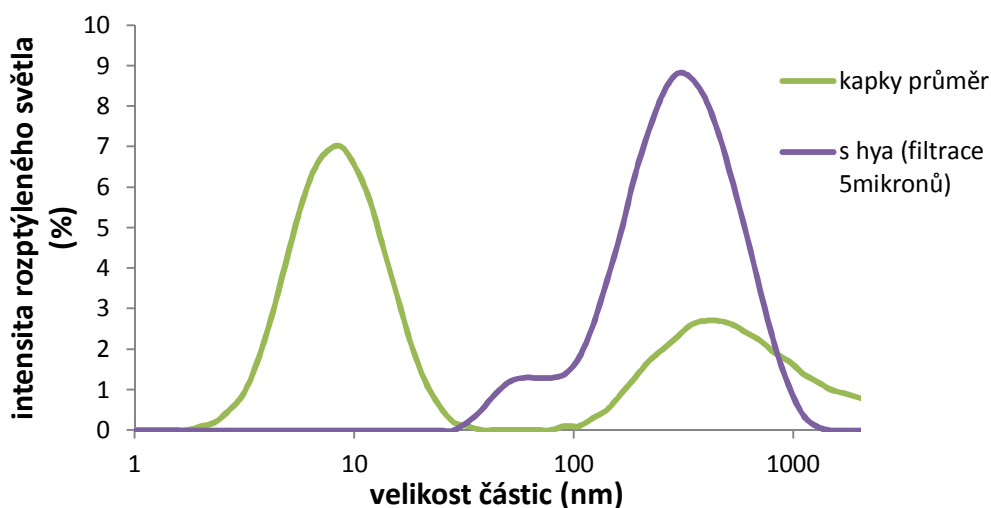
Z Tab. 4 můžeme vidět, že při srovnání přírůstků hmotnosti rohovky ze stejného oka, byl větší přírůstek na rohovce, která byla ponořena do roztoku kapek s hyaluronanem. To by znamenalo, že vzorek s hyaluronanem má větší mukoadhezivitu, že lépe utkvívá na rohovce. Experiment byl zpočátku prováděn pouze na 2 vzorcích prasečí rohovky, a proto byla rohovka rozdělena na čtyři části. Bohužel, ale přírůstky hmotnosti na tak malém kousku rohovky byly téměř nepatrné a proto, nešlo s jistotou určit, zda opravdu dochází ke zvýšení mukoadhezivity. Z tohoto důvodu, byl experiment prováděn znovu na větším počtu rohovek. Jak můžeme vidět v Tab. 4, přírůstek hmotnosti byl ve všech experimentech větší a to i ve srovnání mezi dvěma polovinami jedné rohovky. Pro čistý vzorek kapek byl stanoven na $0,0294 \pm 0,0062g$ a pro vzorek s přísadkou na $0,0477 \pm 0,0045g$. Z toho usuzujeme, že hyaluronan zvýší mukoadhezivitu, kapka bude déle zadržena na očním povrchu, a tím by mělo dojít ke zvýšení účinnosti očního přípravku.



Obr. 12: Vypreparované rohovky

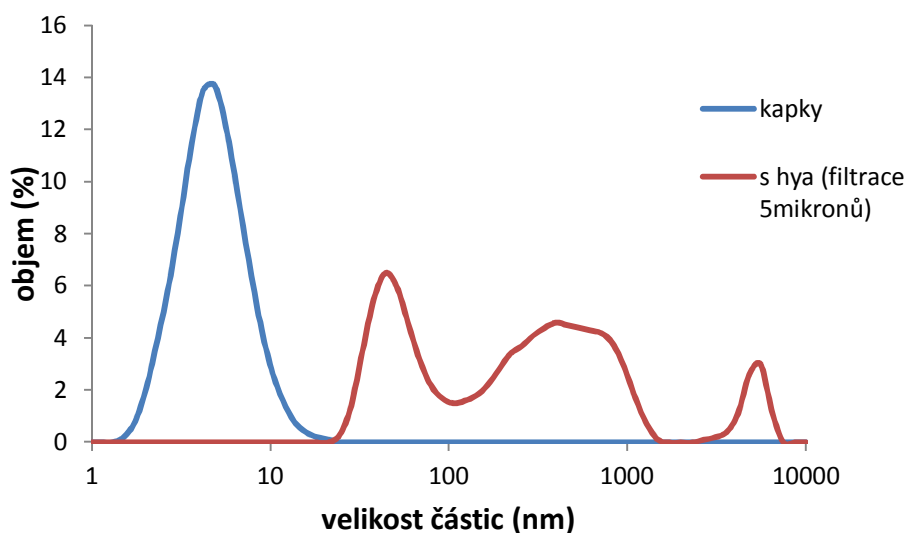
4.5 Měření velikosti částic

Byly proměřeny 2 vzorky. Samotný vzorek Ophthalmo-Septonexu a poté vzorek s přidavkem hyaluronanu. Jelikož se ve vzorku s přidavkem hyaluronanu objevily po 36 hodinách malé vysrážené částečky, byly odfiltrovány přes filtr 5mikronů, z důvodu zkreslení měření. Z měření jsme získali dva grafy. Graf intenzitní distribuce velikosti částic, u kterého je nutno připomenout, že vzorek je vyhodnocován pomocí intenzity rozptylu světla, kde větší částice rozptýlí více světla než částice malé. To je dáno také Rayleighových rozptylem, kde je velikost částice na 6 mocninu.



Graf 7: Intenzitní distribuce velikosti částic

V grafu intenzitní distribuce velikosti částic je vidět, že ve vzorku očních kapek bez přidavku hyaluronanu se vyskytovaly spíše menší částice o velikosti do 10nm, zatímco ve vzorku s přidavkem hyaluronanu se pík pohybuje až mezi 200-400nm. Z toho plyne, že molekula hyaluronanu s navázaným Septonexem, se ve vzorku vyskytuje a je pravděpodobně nějakým způsobem sbalená.



Graf 8: Objemová distribuce velikosti částic

Z grafu objemové distribuce velikosti částic lze vidět, že střed píku vzorku kapek se pohybuje v rozmezí 4–6nm. Ve vzorku s přidavkem hyaluronanu se dle grafu nachází zhruba stejně velké množství částic okolo 50 a 200–400nm.

4.6 Měření náboje částic – zeta potenciál

Zeta potenciál byl proměřen pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS. Bylo změřeno 5 nezávislých opakování po 12–20 skenech při teplotě 25°C. Pro měření byla použita dip elektroda a plastová kyveta. Průměrná hodnota zeta potenciálu vzorku očních kapek byla stanovena na 3,1mV. V druhém vzorku získaném smícháním 5ml očních kapek se 70 μ l hyaluronanu (c=2g/l) došlo po 24hodinách k vysrážení. Vzorek byl následně přefiltrován přes filtr 5mikronů. Zeta potenciál se u tohoto vzorku zvýšil na průměrnou hodnotu 12,7mV.

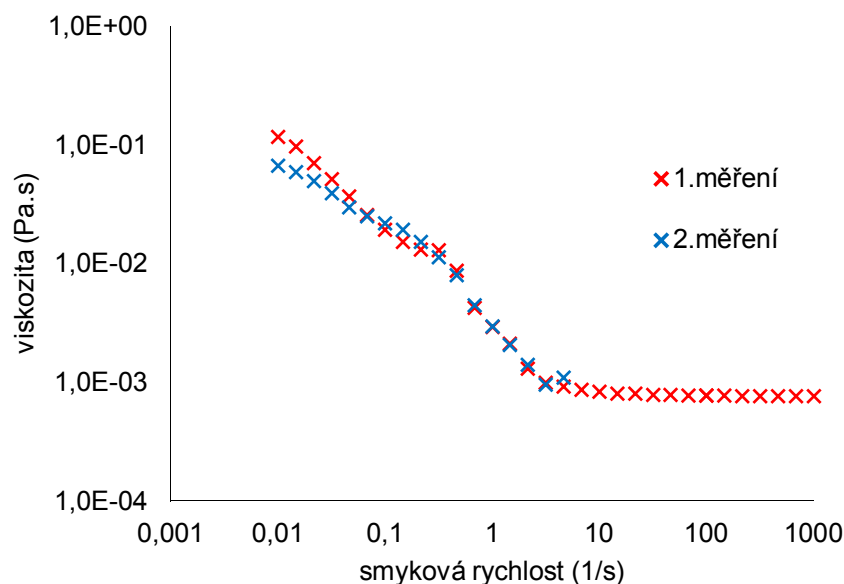
Tab. 6: Naměřené hodnoty zeta potenciálu

Vzorek	ZP [mV]	Průměrný ZP [mV]
kapky 1	4,72	3,1
kapky 2	1,91	
kapky 3	3,84	
kapky 4	3,11	
kapky 5	2,08	
kapky s hya 1	10,1	12,1
kapky s hya 2	12	
kapky s hya 3	14,6	
kapky s hya 4	12,5	
kapky s hya 5	14,3	

Jelikož hyaluronan má záporný zeta potenciál, bylo předpokládáno snížení zeta potenciálu. Z naměřených výsledků zobrazených v Tab. 6 lze usuzovat, že koncentrace hyaluronanu ve vzorku byla příliš velká, a proto se ze vzorku vysrážel a po filtraci se ve vzorku pravděpodobně již nenacházel.

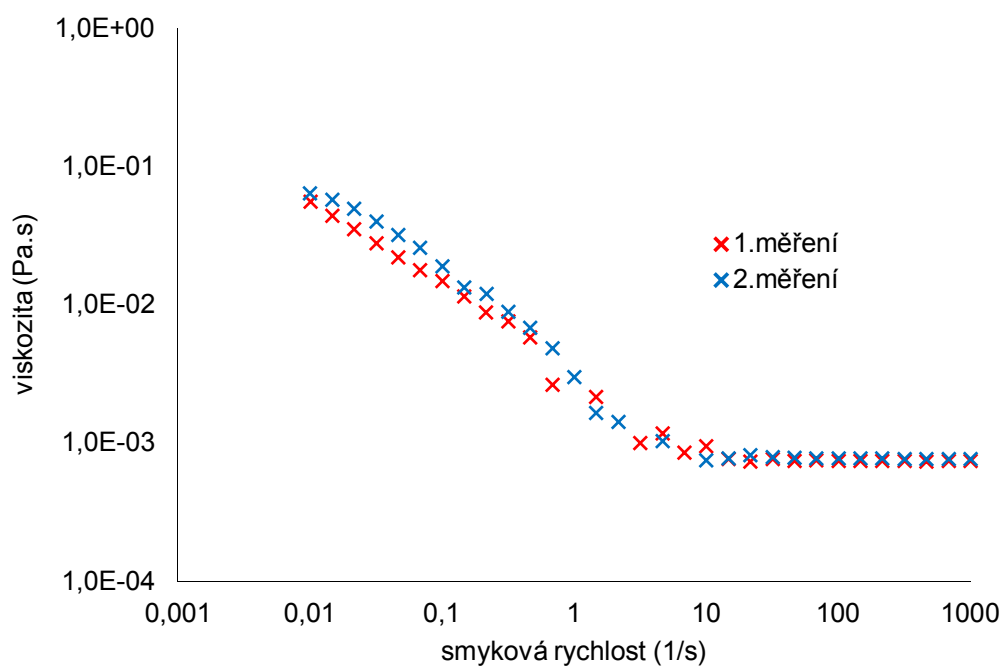
4.7 Měření viskozity

Na přístroji TA Instruments AR-G2 byl spuštěn tokový test double gap. Byly provedeny 2 měření se dvěma vzorky. Jeden vzorek očních kapek a poté oční kapky s přídavkem hyaluronanu (koncentrace zjištěná postupným přídavkem). První měření proběhlo s čerstvým vzorkem, druhé měření bylo provedeno se vzorkem starým 2 dny, ve kterém již byla viditelná malá sraženina. Bylo proměřeno 5ml vzorku v měřicí štěrbině 250 μ m. Rozsah smykových rychlostí byl 0,01–100 s^{-1} při teplotě 25°C. Dále byl nastaven logaritmický mód 6 bodů a povolena 5% odchylka.



Graf 9: Závislost viskozity očních kapek

Z grafu můžeme vidět, že roztok očních kapek se nechová ani jako dilatantní ani jako pseudoplastická kapalina (Graf 9). Dále je zřejmé, že viskozita očních kapek je dle očekávání stále stejná.



Graf 10: Graf závislosti viskozity kapek s přidavkem hyaluronanu

Příklad výpočtu zvýšení viskozity pro klesající oblast. Z této oblasti byla pomocí funkce Spojnice trendu v programu EXCEL stanovena rovnice regrese pro vzorek s přidavkem Hya $y = (-0,1244 \cdot x) + 0,0392$ a pro vzorek očních kapek $y = (-0,0263 \cdot x) + 0,0213$. Proměnná y značí hodnotu viskozity a proměnná x smykovou rychlost. Viskozity v klesající oblasti byly spočítány pro smykovou rychlost $0,1468 \text{ s}^{-1}$. Pro druhou oblast byla hodnota viskozity zprůměrována, jelikož je téměř konstantní.

Výpočet viskozity pro vzorek očních kapek v klesající oblasti:

$$y = (-0,0263 \cdot x) + 0,0213$$

$$y = (-0,0263 \cdot 0,1468) + 0,0213$$

$$y = 0,017 \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

Tab. 7: Výpočet zvýšení viskozity

oblast	smyková rychlost [1/s]		0,1468
pokles	viskozita [Pa·s]		poměr
	s Hya	bez hya	
	0,020	0,017	1,17
konstantní	Průměrná smyková rychlost [1/s]		
	viskozita s Hya [Pa·s]		poměr
	s Hya	bez hya	
	0,0008	0,0008	1

Z porovnání obou grafů je patrné, že po přidavku hyaluronanu došlo při nižších smykových rychlostech k 17 % zvýšení viskozity oproti původnímu roztoku očních kapek. Při vyšších smykových rychlostech byla hodnota viskozity konstantní a stejná pro oba vzorky. Z toho plyne, že při těchto rychlostech již došlo k přerušení všech vazeb, které zvyšovaly viskozitu. Při všech měřeních došlo k nečekanému poklesu viskozity, který by mohl být předmětem dalšího zkoumání. To nemohlo být provedeno z důvodu nedostatečného množství očních kapek (nečekané zmizení výrobku z trhu), ani to nebylo předmětem této bakalářské práce.

ZÁVĚR

Z poznatků uvedených v bakalářské práci vyplývá, že u vzorků proměřovaných po krátkém stání byla dialýzou prokázána interakce mezi kapkami a tenzidem, kdy došlo k tvorbě micel tenzidu na dlouhých řetězcích hyaluronanu. Při zkoumání mukadhezivních vlastností vzorku kapek s hyaluronanem na rohovce jsme zjistili, že ve srovnání se vzorkem očních kapek byl přírůstek hmotnosti větší u vzorku s přídavkem hyaluronanu. Z toho plyne předpokládané zlepšení mukoadhezivních vlastností. To by mělo vést ke zvýšení doby zádrže kapky s léčivem na očním povrchu a snížit četnost aplikace léčiva.

Dále byla zkoumána stabilita systému a velikost částic. K tomuto měření byly použity převážně vzorky po delším stání, které již nevykazovaly koloidní stabilitu. Při proměřování zeta potenciálu, tedy stability molekuly, došlo k nečekanému zvýšení kladného potenciálu, místo předpokládaného snížení v důsledku přítomnosti hyaluronanu. Z toho lze usuzovat, že maximální možná koncentrace hyaluronanu byla překročena a došlo k vysrážení. Po přefiltrování se hyaluronanu pravděpodobně ve vzorku nenacházel. Při proměření velikosti částic a porovnání s původním roztokem kapek bylo vidět, že k částečnému navázání tenzidu na nevysrážený hyaluronan došlo. Molekula byla pravděpodobně stočena do „klubíčka“, protože samotné řetězce by musely vykazovat větší velikost. Při stanovování viskozity vzorku očních kapek s přídavkem a bez přídavku je patrné, že díky hyaluronanu dochází ke zvýšení viskozity zejména při nižších smykových rychlostech. Při vyšších smykových rychlostech jsou viskozity obou vzorků srovnatelné a vazby mezi molekulami jsou přerušeny. V grafech můžeme vidět nečekaný průběh křivky – klesající oblast, který by mohl být předmětem dalšího zkoumání.

Problém koloidní stability se vyskytl až při použití starších vzorků z důvodu omezeného množství očních kapek. Postupným přídavkem byla přijatelná koncentrace hyaluronanu stanovena na nejvýše 0,028g/l. V experimentu byl přídavek hyaluronanu do očních kapek přidáván v pěti minutých intervalech a změny sledovány vizuálně. V průběhu vypracovávání bakalářské práce se ukázalo, že pěti minutové intervaly nejsou dostatečné na zajištění dlouhodobé koloidní stability očních kapek po přídavku hyaluronanu. Bohužel z logistických důvodů, kdy přípravek prakticky zmizel z trhu a bylo nutné pracovat pouze s omezeným množstvím, nebylo možné již tento experiment zopakovat. Pro další výzkum by bylo vhodné experiment poněkud pozměnit a připravit si například 10 vzorků očních kapek, kdy do každého vzorku by bylo přidáno jiné množství hyaluronanu. Vzorky by měly být poté sledovány z hlediska koloidní stability v dlouhém časovém intervalu, minimálně tři měsíce, v ideálním případě až do data expirace očních kapek.

SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Laurent TC a Fraser JR. In: Hyaluronan. [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1563592>
- [2] Lékopis. Lékopis [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Carbethopendecinii_bromidum.htm
- [3] DUBOW, Burt. Eye Drops: Which Ones Work Best? All about vision [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: • <http://www.allaboutvision.com/buysmart/eye-drops.htm>
- [4] Kyselina hyaluronová a oči. KYSELINA HYALURONOVÁ - MOLEKULA MLÁDÍ: Vše o kyselině hyaluronové [online]. [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: <http://www.molekula-mladi.cz/kyselina-hyaluronova-a-oci>
- [5] KUNA, Miloslav. 2008. Mukoadhezivní tablety. Praktické lékařství. (5). Dostupné také z: <http://www.praktickelekarenstvi.cz/artkey/lek-200805-0012.php>
- [6] ODEHNAL, Milan, Květoslava FERROVÁ a Jiří MALEC. 2010. Léčba suchého oka: Poruchy slzných žláz, slzného filmu a využití umělých slz v praxi. Praktické lékařství. (3): 149-152. Dostupné také z: www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2010/03/10.pdf
- [7] LÁZNIČKA, Lukáš. 2014. Nežádoucí účinky léků na oko a jeho funkce. Praktické lékařství. : 177-179. Dostupné také z: www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2014/05/07.pdf
- [8] ODEHNAL, Milan a Jiří MALEC. 2013. Problematika suchého oka. Klinická farmakologie a farmacie. : 61-67. Dostupné také z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2013/02/03.pdf>
- [9] FEUERMANNOVÁ, Alena. 2012. Oční symptomy alergika a jejich léčba. Interní medicína pro praxi. : 165–168. Dostupné také z: www.internimedicina.cz/pdfs/int/2012/04/07.pdf
- [10] GAJDZIOK, JAN a DAVID VETCHÝ. 2012. MUKOADHEZIVNÍ POLYMERY V LÉKOVÝCH FORMÁCH. Chemické listy. : 632-638. Dostupné také z: www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_07_632-638.pdf
- [11] GAJDZIOK, J., M. BAJEROVÁ, K. DVOŘÁČKOVÁ, R. MASTEIKOVÁ a P. KOLLÁR. 2008. Polosyntetické deriváty celulosy jako základ hydrofilních gelových systémů. ČESKÁ A SLOVENSKÁ FARMACIE. 57(2): 63-69. Dostupné také z: http://www.researchgate.net/publication/5276661_Semisynthetic_cellulose_derivatives_as_the_base_of_hydrophilic_gel_systems

- [12] Kyselina hyaluronová. 2001-. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2015-05-14]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_hyaluronová
- [13] CIMALOVÁ, Jana. 2011. IONOKOMPLEXY HYALURONANU PRO KOSMETICKÉ A FARMACEUTICKÉ ÚCELY. BRNO. Dostupné také z: https://www.vutbr.cz/studium/zaverecne-prace?zp_id=36784. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.
- [14] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.
- [15] LUKÁČOVÁ, O. a J. LUKÁČ. *Farmakologická léčba osteoartrózy*. [online], [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.sk/data/soubory/casopisy/mediNEWS/02-2014/10.pdf>
- [16] MACHAŇOVÁ, Darmar. . *POVRCHOVÉ AKTIVNÍ LÁTKY* [online]. In: . 2013 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: <http://www.ft.tul.cz/depart/ktm/files/20130311/TCH-%C3%BAloha3-Povrchov%C4%9B%20aktivn%C3%AD%20l%C3%A1tky.pdf>
- [17] HOLMBERG, Krister. *Surfactants and polymers in aqueous solution*. 2nd ed. /. Hoboken, NJ: John Wiley, c2003, xvi, 545 p. ISBN 04-714-9883-1
- [18] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [19] *UV-VIS Absorption Spectroscopy* [online]. 2010 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/molspec/uvvisab1.htm>
- [20] HOFMANN, Klaus. *Enzymes and Metabolites in Picric Acid (2,4,6-Trinitrophenol) and 2,4-Dinitrophenol Biodegradation*. Universität Stuttgart, 2003. Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart.
- [21] ŠNITA, Dalimil. *Chemické inženýrství I*. Vyd. 1. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2005, 318 s. ISBN 80-708-0589-7.
- [22] Dialysis Methods for Protein Research. *Www.piercenet.com* [online]. 2014 [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/method/dialysis-methodsprotein-research#procedure>

- [23] HASAL, Pavel, Igor SCHREIBER a Dalimil ŠNITA. *Chemické inženýrství I*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2007, 350 s. ISBN 978-80-7080-629-6.
- [24] WURSTER, Dale a Pornpen WERAWATGANONE. Influence of the Polymer–Micelle Interaction on Micelle-Substrate Binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, **99**(3), 1440–1451.
- [25] YUAN, Xiaoyong, Daniela C. MARCANO, Crystal S. SHIN, Xia HUA, Lucas C. ISENHART, Stephen C. PFLUGFELDER a Ghanashyam ACHARYA. Ocular Drug Delivery Nanowafer with Enhanced Therapeutic Efficacy. *ACS Nano*. 2015, **9**(2), 1749-1758. DOI: 10.1021/nm506599f. ISSN 1936-0851. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nm506599f>
- [26] Příbalový leták OPTHALMOSEPTONEX. *Příbalový leták* [online]. [cit. 2016-01-09]. Dostupné z: <http://www.pribalovy-letak.cz/33-ophthalmo-septonex>
- [27] Dynamický rozptyl světla. *Malvern Zetasizer Nano ZS* [online]. Department of Condensed Matter Physics Faculty of Mathematics and Physics, Charles University [cit. 2016-04-20]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/dls.htm>
- [28] Zeta potenciál zeta. *Malvern Zetasizer Nano ZS* [online]. Department of Condensed Matter Physics Faculty of Mathematics and Physics, Charles University [cit. 2016-04-25]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [29] Závislost viskozity na procesních a molekulárních parametrech. *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_03.pdf
- [30] Tokové chování polymerních tavenin – reologické modely. *Učební texty Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně* [online]. [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: http://ufmi.ft.utb.cz/texty/fyzika_pol/FP_02.pdf
- [31] Thalberg, K., Lindman, B.: Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *Journal of Physical Chemistry*, 1989, vol. 93, pp 1478-1483.
- [32] Yuguo, L., Rahim, M., Quinn, N., Segura, T.: Hyaluronic acid and fibrin hydrogels with concentrated DNA/PEI polyplexes for local gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 2011. 6 p.
- [33] YU-JIN, Jin. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2010, roč. 40, 33-43.
- [34] JONES, Marie-Christine a Jean-Christophe LEROUX. Polymeric micelles – a new generation of colloidal drug carriers. [online]. 1999, roč. 48, č. 2, s. 101-111 [cit. 2013-12-16].

- [35] WURSTER, Dale Eric a Pornpen WERAWATGANONE. Influence of the Polymer–Micelle Interaction on Micelle-Substrate Binding. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010, roč. 99, č. 3, 1440–1451
- [36] MANSURI, Shakir, Prashant KESHARWANI, Keerti JAIN, Rakesh K. TEKADE a N.K. JAIN. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*. 2016, **100**, 151-172. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011. ISSN 13815148. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1381514816300104>
- [37] MACHOVÁ, Vanda. Schéma vrstev slzného filmu. In: *WikiSkripta* [online]. 2013 [cit. 2016-05-19]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Oko-slzný_film.png
- [38] KARGEROVÁ, Andrea. Studium tvorby micel. In: *CHEMPOINT: Vědci pro chemii a praxi* [online]. [cit. 2016-05-19]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/studium-tvorby-micel>

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Kalibrační přímka septonexu – průměrná hodnota	29
Graf 2: Absorbční spektrum Septonexu v chloroformu – 1.měření	30
Graf 3: Graf přestupu tenzidu z retentátu do permeátu	31
Graf 4: Graf průběhu dialýzy kapek s Hya	32
Graf 5: Průběh dialýzy očních kapek	32
Graf 6: Vyhodnocení dialýzy	33
Graf 7: Intenzitní distribuce velikosti částic	35
Graf 8: Objemová distribuce velikosti částic	36
Graf 9: Závislost viskozity očních kapek	37
Graf 10: Graf závislosti viskozity kapek s přidavkem hyaluronanu	38

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Aplikace nanodestičky s léčivem pro léčbu oka [26]	10
Obr. 2: Strukturní vzorec karbethopendeciniumbromidu	11
Obr. 3: Schéma produkce slz [6]	11
Obr. 4: Struktura slzného filmu [38]	12
Obr. 5: Strukturní vzorec kyseliny hyaluronové [12]	18
Obr. 6: Struktura micely a molekuly tenzidu [39]	20
Obr. 7: Elektronové přechody v molekule	21
Obr. 8: Schéma dvoupaprskovitého spektrometru	21
Obr. 10: Závislost viskozity na čase	24
Obr. 9: Závislost viskozity na smykové deformaci	24
Obr. 11: Separace fází po extrakci	28
Obr. 18: Vypreparované rohovky	35

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Stupně závažnosti onemocnění syndromu suchého oka [6]	13
Tab. 2: Léčba suchého oka podle závažnosti [6]	13
Tab. 3: Sledování vlivu přídatku hyaluronanu	30
Tab. 4: Přírůstek hmotnosti rohovky	34
Tab. 5: Vyhodnocení	34
Tab. 6: Naměřené hodnoty zeta potenciálu	36
Tab. 7: Výpočet zvýšení viskozity	38

SEZNAM ZKRATEK

UV	ultrafialové
VIS	viditelné
KH	kyselina hyaluronová
CMC	kritická micelární koncentrace
Hya	hyaluronan sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance